

539,790

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Juli 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/055117 A2**

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation: <b>C09B</b></p> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/014534</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum:<br/>18. Dezember 2003 (18.12.2003)</p> <p>(25) Einreichungssprache: Deutsch</p> <p>(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch</p> <p>(30) Angaben zur Priorität:<br/>102 59 374.4 18. Dezember 2002 (18.12.2002) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): <b>ATTO-TEC GMBH</b> [DE/DE]; Schanzenweg 50, 57076 Siegen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>ARDEN-JACOB, Jutta</b> [DE/DE]; Am Hügel 25, 90513 Zirndorf (DE). <b>DREXHAGE, Karl-Heinz</b> [DE/DE]; Schanzenweg 50, 57076 Siegen (DE). <b>HAMERS-SCHNEIDER, Monika</b> [DE/DE]; Am Elger 14, 57258 Freudenberg (DE). <b>KEM-NITZER, Norbert</b> [DE/DE]; Lahnstr. 74, 57250 Netphen (DE). <b>ZILLES, Alexander</b> [DE/DE]; Simmerner Str. 3A, 55490 Mengerschied (DE).</p> <p>(74) Anwälte: <b>WEICKMANN &amp; WEICKMANN</b> usw.; Postfach 860 820, 81635 München (DE).</p> | <p>(81) Bestimmungsstaaten (<i>national</i>): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.</p> <p>(84) Bestimmungsstaaten (<i>regional</i>): ARIPO-Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Erklärung gemäß Regel 4.17:</b><br/>— <i>Erfindenerklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US</i></p> <p><b>Veröffentlicht:</b><br/>— <i>ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts</i></p> <p><i>Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.</i></p> |
|---|--|

(54) Title: CARBOXAMIDE-SUBSTITUTED DYES FOR ANALYTICAL APPLICATIONS

(54) Bezeichnung: CARBOXAMID-SUBSTITUIERTE FARBSTOFFE FÜR ANALYTISCHE ANWENDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to carboxamide-substituted dyes, the production and use of such dyes as labelling groups in analysis.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Carboxamid-substituierte Farbstoffe, deren Herstellung und auf die Verwendung solcher Farbstoffe als Markierungsgruppen in der Analytik.

WO 2004/055117 A2

## **Carboxamid-substituierte Farbstoffe für analytische Anwendungen**

### **Beschreibung**

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Carboxamid-substituierte Farbstoffe, deren Herstellung und auf die Verwendung solcher Farbstoffe als Markierungsgruppen in der Analytik.

10

Farbstoffe aus der Klasse der Xanthen- und Triphenylmethanfarbstoffe sowie verwandte Derivate werden aufgrund ihrer sehr guten spektralen Eigenschaften bevorzugt in der chemischen, biologischen und medizinischen Analytik als Markierungsgruppen eingesetzt (J. Slavik, *Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994). Farbstoffe aus verwandten Klassen der Carbopyronine und Amidopyrylium-Farbstoffe werden beschrieben in WO 00/64986 und WO 00/64987. Dabei spielen vor allem Farbstoffe mit einer sehr hohen Fluoreszenzquantenausbeute eine wichtige Rolle, da über die Fluoreszenz ein sehr empfindlicher Nachweis des markierten Analyten möglich ist. Aber auch nicht-fluoreszierende Derivate gewinnen zunehmend als Quencher in speziellen Verfahren Bedeutung.

20

Zur Verwendung als Markierungsgruppen in Nachweisverfahren für Analyten ist neben einer einfachen und zuverlässigen Nachweisbarkeit eine gute Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln, insbesondere in wässrigen Systemen, erforderlich. Weiterhin sollten derartige Verbindungen einfach und kostengünstig herzustellen sein und eine hohe Stabilität und Lagerfähigkeit aufweisen.

25

Viele Farbstoffe aus den oben genannten Farbstoffklassen besitzen eine Carboxylgruppe, die aufgrund ihrer Position und der Molekülstruktur in Abhängigkeit von Lösungsumgebung und pH-Wert, z.B. bereits in

30

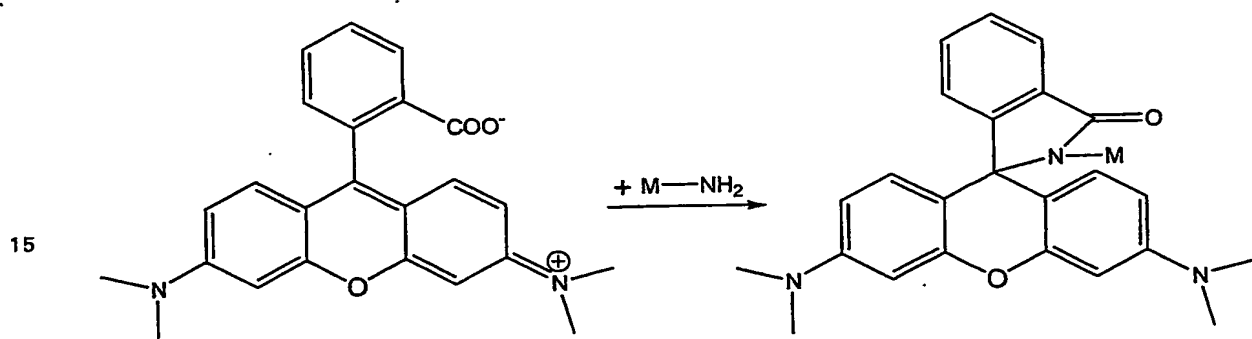
- 2 -

neutraler oder schwach basischer Lösung, zur Bildung eines farblosen Lactons Anlass gibt. Vgl. dazu etwa K.H. Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes, in: F.P. Schäfer, Topics in Applied Physics, Vol. 1, Dye Lasers, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973.

5

Bei der üblichen kovalenten Kopplung, z.B. über einen Aktivester, einer derartigen Carboxylgruppe an die primäre Aminogruppe eines Analyten (Peptid etc.) entsteht ein Säureamid, das sich sofort gemäß dem folgenden Schema zu einem Lactam umlagert:

10



15

Farbstoff

Lactam: farblos

20

Dieses ist jedoch unter physiologischen Bedingungen farblos, so dass die Farbstoffmarkierung fehlschlägt. Das heißt, der markierte Analyt kann nicht durch die Absorption und/oder Fluoreszenz der Markierungsgruppe nachgewiesen werden. Viele bekannte und leicht zugängliche Farbstoffe (z.B. Rhodamine) scheiden deshalb für die Verwendung als Marker-Farbstoffe aus. Diese Schwierigkeit ließ sich bisher nur dadurch umgehen, dass man zusätzliche Kopplungsgruppen in das Farbstoffmolekül eingeführt hat. Die dazu erforderlichen Vorprodukte sind jedoch meist schwer zugänglich und erfordern aufwändige Syntheseschritte.

25

30

- 3 -

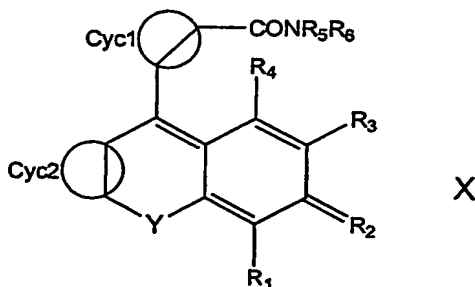
WO 02/055512 offenbart die Herstellung von Amid-Derivaten von Fluorescein-Farbstoffen, wobei die Carbonsäuregruppe zunächst bei höheren Temperaturen zu einem Aktivester umgesetzt und dann der Aktivester mit einem sekundären Amin in einem wässrigen Lösungsmittelgemisch zur Reaktion gebracht wird. Das Verfahren gemäß  
5 WO 02/055512 ist nur anwendbar auf Fluorescein und seine Derivate und kann nicht auf andere Farbstoffklassen übertragen werden. Insbesondere sind die offenbarten Verfahrensbedingungen, wie Temperatur und verwendete Lösungsmittel, nicht auf Amino- oder/und Iminogruppen-  
10 enthaltende Verbindungen, wie beispielsweise Rhodamine, anwendbar. Zum einen führen die bei der Aktivesterbildung eingestellten Temperaturen zu Neben- und Zersetzungsprodukten, zum anderen kann das bei der Umsetzung des Aktivesters mit einem Amin als Lösungsmittel verwendete Wasser mit dem Aktivester reagieren, was wiederum unerwünschte  
15 Produkte zur Folge hat.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, Lacton- bzw. Lactam-bildende Farbstoffe mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen auf einfache Weise so zu modifizieren, dass sie als Marker in verschiedenen  
20 Bereichen Verwendung finden können.

Gelöst wird diese Aufgabe durch Bereitstellung eines Carboxamid-substituierten Farbstoffs der allgemeinen Formel (I)

25

30



- 4 -

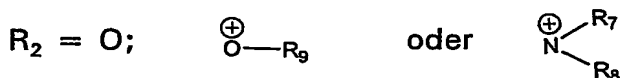
wobei

Y = Sauerstoff, Schwefel, Selen,  $\text{CR}_a\text{R}_b$ ,  $\text{NR}_c$ , eine direkte Verknüpfung oder  $-\text{R}_{14}$  und  $-\text{R}_{15}$  darstellt;

$\text{R}_1$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  unabhängig Wasserstoff, Halogen (wie Fluor, Chlor, Brom, Jod),  $-\text{O}^\ominus$ , eine Hydroxygruppe, Thiolgruppe, Aminogruppe, Ammoniumgruppe, Sulfogruppe, Phosphogruppe, Nitrogruppe, Carbonylgruppe (z.B. Keto- oder Aldehydgruppe), Carboxygruppe, ein Carbonsäurederivat (wie Carboxylat, Ester, Halogenid, Amid, Anhydrid), Nitrilgruppe, Isonitrilgruppe, Cyanatgruppe, Isocyanatgruppe, Thiocyanatgruppe, Isothiocyanatgruppe oder einen geradkettigen, verzweigten oder cyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit bis zu 40 Kohlenstoffatomen darstellen;

$\text{R}_a$ ,  $\text{R}_b$ ,  $\text{R}_c$  und  $\text{R}_{14}$ ,  $\text{R}_{15}$  unabhängig die gleichen Bedeutungen haben, wie es für  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  definiert ist;

15

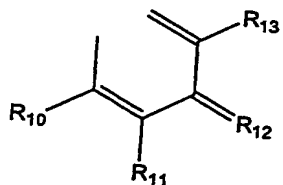


darstellt, wobei

$\text{R}_7$ ,  $\text{R}_8$ ,  $\text{R}_9$  unabhängig Wasserstoff oder einen geradkettigen, verzweigten oder cyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit bis zu 40 Kohlenstoffatomen darstellen; oder

$\text{R}_1$  zusammen mit  $\text{R}_2$

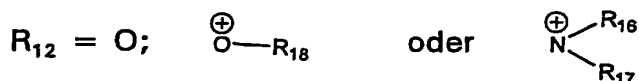
25



darstellt, wobei

$\text{R}_{10}$ ,  $\text{R}_{11}$ ,  $\text{R}_{13}$  die gleichen Bedeutungen haben, wie es für  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  definiert ist;

30



- 5 -

darstellt, wobei

$R_{16}$ ,  $R_{17}$ ,  $R_{18}$  die gleichen Bedeutungen aufweisen, wie es für  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$  definiert ist;

5  $R_5$ ,  $R_6$  unabhängig einen geradkettigen, verzweigten oder cyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit bis zu 40 Kohlenstoffatomen darstellen;

10 Cyc1 einen organischen Rest darstellt, der ein Ringsystem umfasst, ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden und cycloaliphatischen Ringen;

Cyc2 einen organischen Rest darstellt, der ein Ringsystem umfasst, ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden und cycloaliphatischen Ringen;

15

wobei jeder der Reste in der Verbindung gemäß Formel (I) mit einem oder mehreren benachbarten Resten ein Ringsystem bilden kann;

und X, wenn es zum Ladungsausgleich erforderlich ist, ein oder mehrere ein- oder mehrwertige Anionen darstellt;

20 mit der Maßgabe, dass in der allgemeinen Formel (I) nicht gleichzeitig

- Y = Sauerstoff

- Cyc1 = Phenyl oder substituiertes Phenyl,

- Cyc2 = Hydroxy-, Ether- oder Ester-substituiertes Phenyl

und

25 -  $R_2 = O$

darstellen.

Vorzugsweise sind die Substituenten in der allgemeinen Formel (I) so gewählt, dass nicht gleichzeitig

30

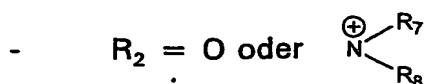
- Y = Sauerstoff

- Cyc1 = Phenyl oder substituiertes Phenyl,

- Cyc2 = Phenyl oder substituiertes Phenyl

- 6 -

und



- 5 wenn  $R_7$  oder/und  $R_8$  kein Ringsystem mit benachbarten Substituenten bildet,  
darstellen.

Überraschenderweise gelang es, unterschiedlich funktionalisierte Farbstoffe  
10 gemäß der allgemeinen Formel (I) bereitzustellen, welche sehr gute spektrale Eigenschaften, wie Lage der Absorptions- und Fluoreszenzbanden, hohe Extinktionskoeffizienten sowie hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und Stabilitäten aufweisen. Der Nachteil der Lacton- bzw. Lactambildung, der bei gewöhnlich verwendeten Carboxyl-  
15 substituierten Farbstoffen auftritt, wird durch die Generierung von sekundären Amidgruppen verhindert.

Es hat sich gezeigt, dass außerdem durch die Einführung von verschiedenen Resten an der Amid-Gruppe die Eigenschaften des  
20 Farbstoffs gesteuert werden können. So kann beispielsweise die Lipophilie des Farbstoffs durch Einführung von langen Alkylketten als Reste an der Amidgruppe erhöht werden. Andererseits kann durch Einführung von z.B. Zucker-Resten oder anderen polaren Gruppen die Hydrophilie des Farbstoffs erhöht werden. Dadurch lassen sich auf einfache Weise die Eigenschaften,  
25 wie das Löslichkeitsverhalten, modulieren. Des Weiteren können an der Amidgruppe verschiedene Linker eingebaut werden, um den Farbstoff über diese Linker z.B. an einen nachzuweisenden Analyten, wie ein Peptid oder ähnliches, koppeln oder konjugieren zu können.

30 Erfindungsgemäß umfassen die Kohlenwasserstoffgruppen Alkylgruppen, Alkenylgruppen, Alkynylgruppen, Cycloalkylgruppen, Arylgruppen und Heteroarylgruppen. Diese Gruppen können Heteroatome, wie Sauerstoff,

- 7 -

Schwefel oder/und Stickstoff, enthalten. Des Weiteren können an diese Gruppen weitere Substituenten gebunden sein, die vorzugsweise ausgewählt sind aus Halogen (wie Fluor, Chlor, Brom, Jod),  $-O^{\ominus}$ , einer Hydroxygruppe, Thiolgruppe, Aminogruppe, Ammoniumgruppe, Sulfogruppe, Phosphogruppe, Nitrogruppe, Carbonylgruppe (z.B. Keto- oder Aldehydgruppe), Carboxygruppe, einem Carbonsäurederivat (z.B. Carboxylat, Ester, Carbonsäurehalogenid, -amid, -anhydrid), einer Nitrilgruppe, Isonitrilgruppe, Cyanatgruppe, Isocyanatgruppe, Thiocyanatgruppe, Isothiocyanatgruppe, Iminogruppe, Iminiumgruppe, Alkoxygruppe, Ethergruppe, Thioethergruppe und geradkettigen, verzweigten oder cyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffgruppen mit bis zu 40 Kohlenstoffatomen.

Der Ausdruck "Alkylgruppen" umfasst dabei geradkettige oder verzweigte  $C_1$ - $C_{40}$ -Alkylgruppen, vorzugsweise  $C_2$ - $C_{35}$ -Alkylgruppen, mehr bevorzugt  $C_5$ - $C_{30}$ -Alkylgruppen, noch mehr bevorzugt  $C_8$ - $C_{20}$ -Alkylgruppen. Beispielsweise sind die Alkylgruppen ausgewählt aus Methyl, Ethyl und geradkettigen oder verzweigten Propyl-, Butyl-, Hexyl-, Decyl-, Dodecyl- und Octadecylgruppen.

Die "Alkenylgruppen" umfassen geradkettige oder verzweigte  $C_2$ - $C_{40}$ -Alkenylgruppen mit ein oder mehreren Doppelbindungen an beliebiger Stelle des Kohlenwasserstoffrestes. Je nach Kettenlänge sind 1-10, 2-8 oder 4-6 Doppelbindungen pro Rest bevorzugt. Die Alkenylreste weisen 2-40, vorzugsweise 4-35, mehr bevorzugt 8-25, noch mehr bevorzugt 15-20 Kohlenstoffatome auf. Beispiele für geeignete Alkenylgruppen sind Ethenyl, Propenyl, Butenyl, Hexenyl, Decenyl, Dodecenyl und Octadecenyl.

In den geradkettigen oder verzweigten Alkinylnresten liegen entsprechend ein oder mehrere Dreifachbindungen an beliebiger Position des Kohlenwasserstoffrestes vor. Je nach Kettenlänge sind 1-10, 2-8 oder 4-6 Dreifachbindungen pro Rest bevorzugt. Die Alkinylnreste weisen 2-40,



- 8 -

vorzugsweise 4-35, mehr bevorzugt 8-25, noch mehr bevorzugt 15-20 Kohlenstoffatome auf. Beispiele für geeignete Alkynylgruppen sind Ethinyl, Propinyl, Butinyl, Hexinyl, Decinyl, Dodecinyl und Octadecinyl.

5 Die Cycloalkylgruppen können gesättigt oder ungesättigt sein, d.h. gegebenenfalls ein oder mehrere Doppel- oder/und Dreifachbindungen aufweisen. Bevorzugt sind C<sub>3</sub>-C<sub>40</sub>-Cycloalkylgruppen, mehr bevorzugt C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>-Cycloalkylgruppen, noch mehr bevorzugt C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>-Cycloalkylgruppen, noch mehr bevorzugt C<sub>5</sub>- oder C<sub>6</sub>-Cycloalkylgruppen. Insbesondere sind  
10 geeignete Cycloalkylgruppen ausgewählt aus Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclopentenyl, Cyclohexyl, Cyclohexenyl, Cyclohexadienyl und Cyclooctyl. Des Weiteren können die C<sub>3</sub>-C<sub>40</sub>-Cycloalkylgruppen überbrückt sein und bicyclische bzw. polycyclische Verbindungen bilden. Beispiele für polycyclische Reste sind Norbornan-, Norbornen- und Bicyclo  
15 [3.2.2]octyl-Reste bzw. die jeweiligen substituierten Derivate davon. Die Cycloalkylgruppen schließen außerdem aliphatische Heterocyclen ein, wie z.B. Tetrahydropyrrol-, Piperidin-, Dioxan-, Tetrahydrofurangruppen.

Bevorzugte Arylreste sind C<sub>3</sub>-C<sub>40</sub>-Arylgruppen, mehr bevorzugt C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-  
20 Arylgruppen und C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>-Arylgruppen. Beispiele für geeignete Arylgruppen sind Phenyl-, Naphthyl-, Anthracen- und Phenanthrengruppen.

Die Heteroarylgruppen stellen aromatische Reste mit 3-40 Kohlenstoffatomen dar, die ein oder mehrere Heteroatome aufweisen,  
25 wobei die Heteroatome ausgewählt sind aus Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff. Vorzugsweise enthalten die Heteroarylgruppen 1-10, bevorzugt 2-6, mehr bevorzugt 3-5 Heteroatome. Die Heteroarylgruppen enthalten 3-40, insbesondere 3-18, mehr bevorzugt 4-14, noch mehr bevorzugt 5-8 Kohlenstoffatome. Beispiele für geeignete Heteroarylgruppen sind Pyrrol-,  
30 Pyridin-, Pyrimidin-, Indol-, Furan-, Thiophen- und Thiazolgruppen.

- 9 -

Kohlenwasserstoffgruppen, die Heteroatome enthalten, sind z.B. Heteroatom-enthaltende Alkylgruppen, z.B. geradkettige oder verzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>40</sub>-Alkoxygruppen, vorzugsweise C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxygruppen, mehr bevorzugt C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>-Alkoxygruppen, noch mehr bevorzugt C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-  
5 Alkoxygruppen. Beispiele für geeignete Alkoxygruppen sind Methoxy, Ethoxy, geradkettiges oder verzweigtes Propoxy, Butoxy, Decoxy und Undecoxy.

Beispiele für Heteroatom-enthaltende Arylgruppen sind Aryloxygruppen,  
10 wie beispielsweise Phenoxy und Naphthoxy.

Heteroatom-enthaltende Kohlenwasserstoffreste gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen des Weiteren z.B. Carbonylgruppen (wie Keto- oder Aldehydgruppen), Carbonsäuren, Carbonsäurederivate (wie Halogenide,  
15 Ester, Amide, Anhydride, Carboxylate), Ether, Thioether und Alkoxy-carbonylgruppen, welche entsprechend 1-40 Kohlenstoffatome, bevorzugt 2-35, mehr bevorzugt 5-30 und auch bevorzugt 8-20 Kohlenstoffatome enthalten.

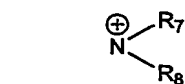
20 Erfindungsgemäß können auch Cyc1 und Cyc2 weiter substituiert sein, wobei die Substituenten vorzugsweise ausgewählt sind aus Halogen (wie Fluor, Chlor, Brom, Jod), -O<sup>9</sup>, einer Hydroxygruppe, Thiolgruppe, Aminogruppe, Ammoniumgruppe, Sulfogruppe, Phosphogruppe, Nitrogruppe, Carbonylgruppe (z.B. Keto- oder Aldehydgruppe),  
25 Carboxygruppe, einem Carbonsäurederivat (wie Carboxylat, Ester, Halogenid, Amid, Anhydrid), einer Nitrilgruppe, Isonitrilgruppe, Cyanatgruppe, Thiocyanatgruppe, Isocyanatgruppe, Isothiocyanatgruppe, Iminogruppe, Iminiumgruppe, oder einer wie oben definierten geradkettigen, verzweigten oder cyclischen ungesättigten oder gesättigten  
30 Kohlenwasserstoffgruppe mit gegebenenfalls ein oder mehreren Heteroatomen.

- 10 -

Jeder der in dem erfindungsgemäßen Carboxamid-substituierten Farbstoff der allgemeinen Formel (I) enthaltenen Reste kann gegebenenfalls mit einem oder mehreren benachbarten Resten ein Ringsystem ausbilden. Das Ringsystem enthält vorzugsweise 5- oder/und 6-gliedrige Ringe. Bevorzugt bilden  $R_1$  mit  $R_8$  oder/und  $R_3$  mit  $R_7$  oder  $R_{11}$  mit  $R_{17}$  oder/und  $R_{13}$  mit  $R_{16}$  ein solches Ringsystem aus.

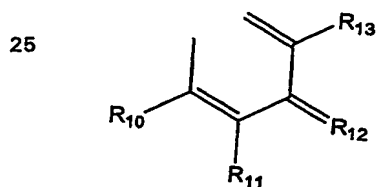
Die gegebenenfalls zum Ladungsausgleich erforderlichen Anionen können ausgewählt sein aus anorganischen oder/und organischen Anionen, wie z.B. Halogeniden, Sulfaten, Carbonaten, Phosphaten, Sulfiten, Sulfiden, Hydroxiden, Alkoxiden, Carboxylaten, Nitraten, Nitriten etc.

Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Carboxamid-substituierten Farbstoffen der allgemeinen Formel (I) um Farbstoffe, in welchen Cyc2 in Formel (I) einen Stickstoff-enthaltenden Heterocyclus oder ein Ringsystem darstellt, welches mit mindestens einer Aminogruppe substituiert ist. Dabei ist weiterhin bevorzugt, dass  $R_2$



darstellt,

oder dass  $R_2$  mit  $R_1$  zusammen

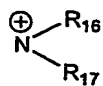


bildet,

30

wobei es besonders bevorzugt ist, wenn  $R_{12}$

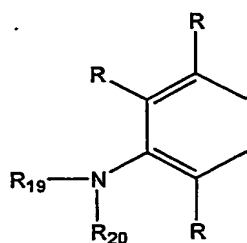
- 11 -



bedeutet.

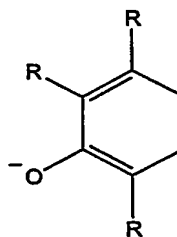
- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist Cyc2 in Formel (I) eine der Strukturen (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G) (H) oder (J) auf:

10

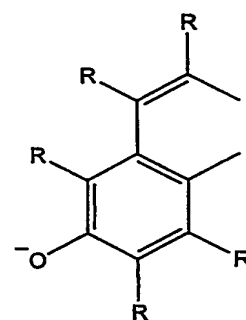


15

(A)

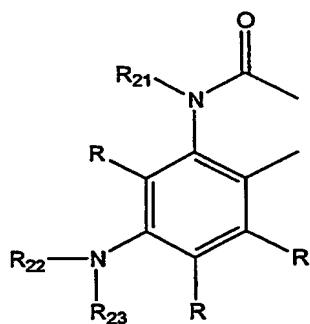


(B)

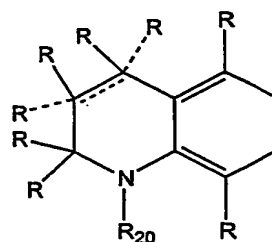


(C)

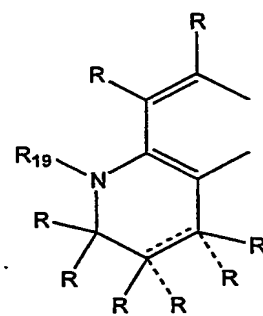
20



(D)

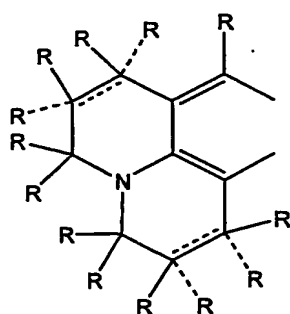


(E)



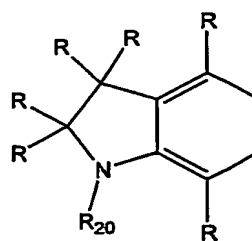
(F)

25

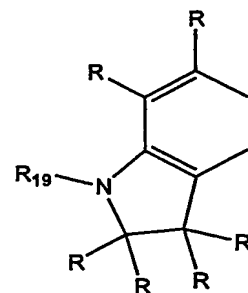


(G)

30



(H)



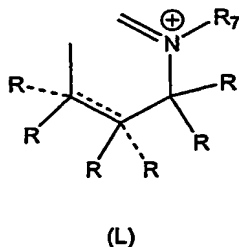
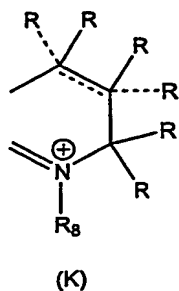
(J)

- 12 -

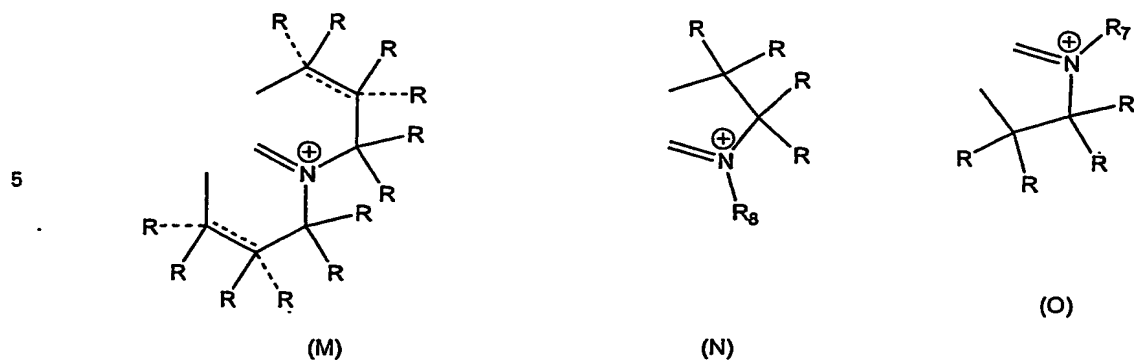
wobei R jeweils unabhängig wie  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  definiert ist,  
 $R_{19}$ ,  $R_{20}$  und  $R_{22}$ ,  $R_{23}$  unabhängig wie  $R_7$ ,  $R_8$  definiert sind; und  
 $R_{21}$  wie  $R_7$  definiert ist und die gestrichelten Linien gegebenenfalls  
Doppelbindungen bedeuten, bei deren Vorhandensein die über eine  
gestrichelte Linie gebundenen Reste fehlen. Die Substrukturen (A) bis (J)  
sind so an die übrige Ringstruktur der Formel (I) kondensiert, dass die  
Verknüpfungsstellen durch Einfach- oder Doppelbindungen miteinander  
verbunden sind. Bevorzugt liegen zwischen den Verknüpfungsstellen  
Doppelbindungen vor.

In den Strukturen (A) bis (J) können benachbarte Substituenten  
gegebenenfalls weitere Ringsysteme wie oben definiert ausbilden. Dabei  
bilden bevorzugt die Reste  $R_{19}$ ,  $R_{20}$  und  $R_{22}$ ,  $R_{23}$  mit den jeweilig  
benachbarten Resten R Ringsysteme, die 5- oder/und 6-gliedrige Ringe  
umfassen, welche gegebenenfalls weitere Heteroatome enthalten können.  
Es ist besonders bevorzugt, dass Cyc2 eine der Strukturen (A), (D), (E), (F),  
(G), (H) oder (J) aufweist.

Die ausgehend von  $R_7$  bzw.  $R_8$  mit benachbarten Substituenten gebildeten  
Ringsysteme führen vorzugsweise zu folgenden Systemen (K), (L), (M), (N)  
oder (O):



- 13 -

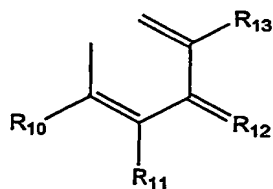


10

wobei R jeweils unabhängig wie  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  definiert ist,  
 und die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten, bei  
 deren Vorhandensein die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste  
 fehlen. Auch in den Substrukturen (K) bis (O) können benachbarte  
 15 Substituenten weitere Ringsysteme wie oben definiert ausbilden.

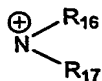
In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung  
 stellt  $R_2$  in Formel (I) zusammen mit  $R_1$

20



25

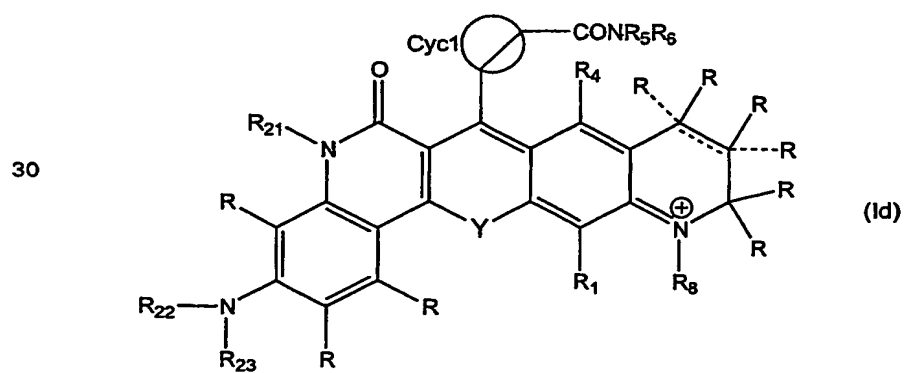
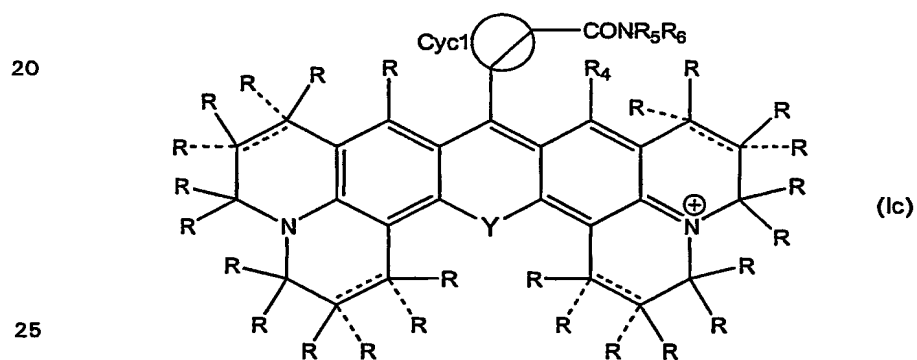
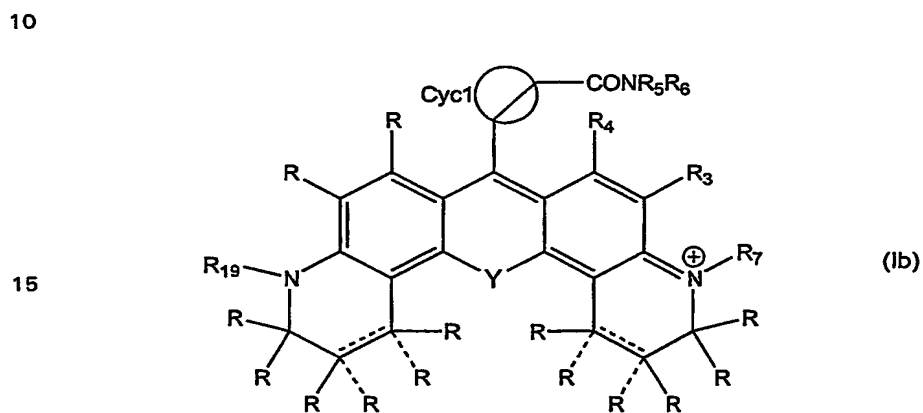
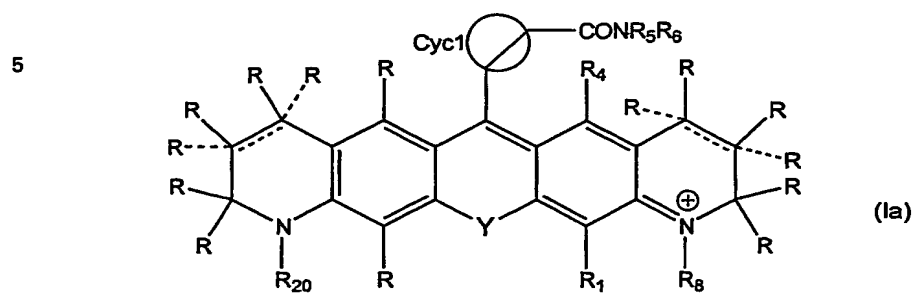
dar. Besonders bevorzugt ist dabei die Gruppe der Farbstoffe, bei denen  $R_{12}$   
 Sauerstoff oder

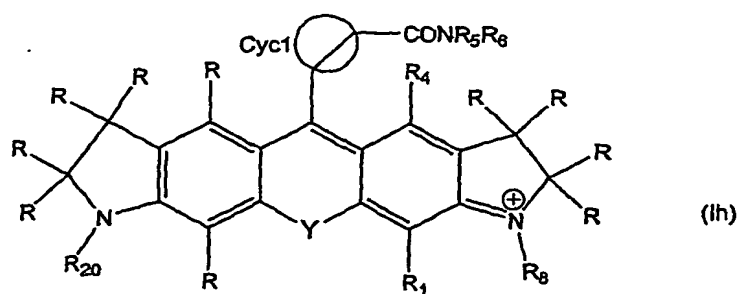
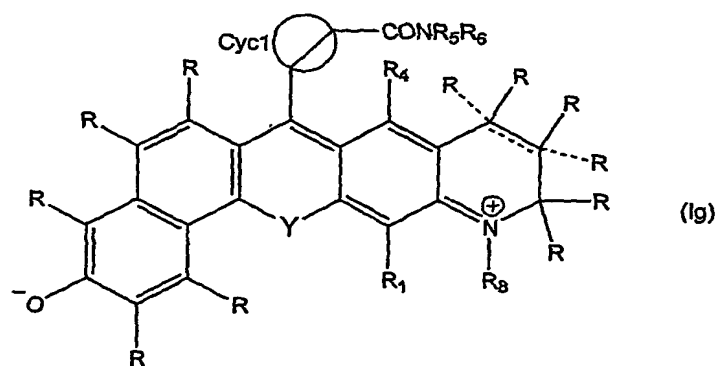
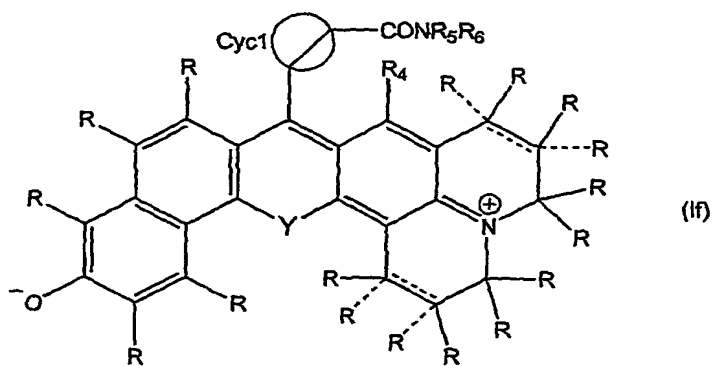
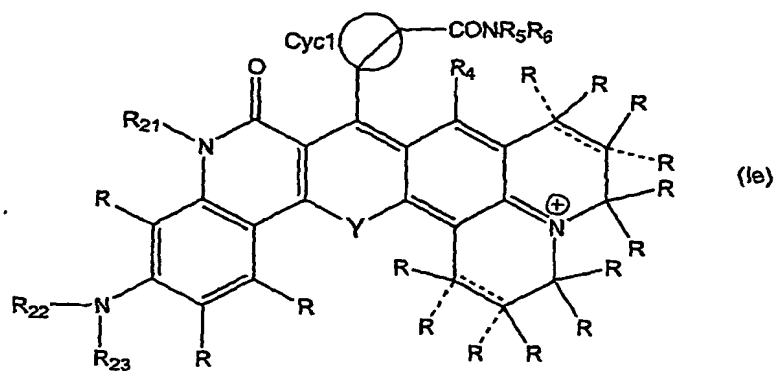


30

darstellt.

Bevorzugte Verbindungsklassen der vorliegenden Erfindung gemäß Formel (I) sind in den Formeln (Ia) bis (Ih) dargestellt:







wobei die Bedeutungen der Reste wie oben definiert sind.

In den erfindungsgemäßen Verbindungen stellt Cyc1 einen gegebenenfalls substituierten organischen Rest dar, der ein Ringsystem umfasst, das  
5 vorzugsweise ausgewählt ist aus substituiertem und unsubstituiertem Phenyl, Naphthyl, Pyridyl und Cyclohexyl.

In den Carboxamid-substituierten Farbstoffen der allgemeinen Formel (I) der vorliegenden Erfindung weisen die Reste  $R_5$  oder/und  $R_6$  der  
10 Carboxamidgruppe vorzugsweise einen Substituenten auf, der geeignet ist, um an andere Moleküle zu koppeln. Besonders bevorzugt kann über einen solchen Substituenten eine kovalente Kopplung erreicht werden. Geeignete Substituenten an  $R_5$  oder/und  $R_6$  sind eine Carboxylgruppe, Aminogruppe, Hydroxylgruppe, Thiolgruppe, Cyanogruppe, Halogengruppe oder/und  
15 Gruppen mit ungesättigten Einheiten, wie z.B. Doppel- und Dreifachbindungen. Mittels dieser Funktionalität können die erfindungsgemäßen Farbstoffe beispielsweise an Biomoleküle oder Träger gebunden werden.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform stellt mindestens einer der Reste  $R_5$  und  $R_6$  eine Carboxy-substituierte Alkylgruppe dar, wobei der nicht mit einer Carboxylgruppe substituierte Rest vorzugsweise eine Alkylgruppe darstellt.

25 Durch Variation der Reste in den erfindungsgemäßen Carboxamid-substituierten Farbstoffen der Formel (I), insbesondere der leicht einfühmbaren Reste  $R_5$  oder/und  $R_6$ , können außerdem die Eigenschaften der resultierenden Farbstoffmoleküle hinsichtlich Löslichkeit und Fluoreszenzeigenschaften auf einfache Weise eingestellt und modifiziert  
30 werden.

- 17 -

Tragen  $R_5$  oder/und  $R_6$  z.B. längere Alkylketten (z.B. Tab. 2, Verb. 56 und 57), so erhöht sich der lipophile Charakter, und die Verbindung ist in unpolaren Medien und Membranen löslich und kann so beispielsweise zum Nachweis von Membraneigenschaften oder zu molekularen Abstandsmessungen eingesetzt werden.

Die Wasserlöslichkeit eines Farbstoffs lässt sich beispielsweise verbessern, wenn  $R_5$  oder/und  $R_6$  etwa Sulfon- oder Phosphonsäuregruppen tragen (z.B. Tab. 2, Verb. 55) oder über Polyetherketten verfügen. Letztere machen die Verbindung auch in vielen organischen Lösungsmitteln besser löslich. Eine Art spezieller Polyether stellen etwa die für den fluoreszenz sensitiven Kationennachweis verwendeten Kronenether dar, die als Aza-Derivate auch über die Carboxamid-Methode an Farbstoffmoleküle gekoppelt werden können (z.B. Tab. 2, Verb. 53).

Weiterhin können beispielsweise Zuckerreste als  $R_5$  oder/und  $R_6$  eingeführt werden, wodurch eine hohe Wasserlöslichkeit erreicht werden kann (siehe z.B. Tab. 2, Verb. 51 NK67).

In den erfindungsgemäßen Farbstoffen wird außerdem der Vorteil erreicht, dass durch unterschiedliche Bedeutungen von Y die Eigenschaften der Carboxamid-substituierten Farbstoffe je nach Verwendungszweck variiert werden können. So weisen beispielsweise Verbindungen mit  $Y = \text{Selen}$  die Eigenschaft auf, dass sie Fluoreszenz auslöschen. Solche Verbindungen sind u.a. wertvoll als Fluoreszenzquencher in der Bioanalytik.

Verbindungen mit  $Y = \text{CR}_a\text{R}_b$  dagegen führen beispielsweise zu einer langwelligen Verschiebung in den roten Bereich verglichen mit Fluorescein bzw. entsprechenden Xanthen-Farbstoffen, wie Rhodaminen. Solche Verbindungen sind u.a. nützlich, um starkes Untergrundrauschen bei der Detektion, wie es herkömmlich verwendete Farbstoff-Derivate aufweisen,

- 18 -

zu vermeiden. Beispiele solcher erfindungsgemäßen Verbindungen sind die Verbindungen 13 und 14 aus Tabelle 1 (NK65, NK66).

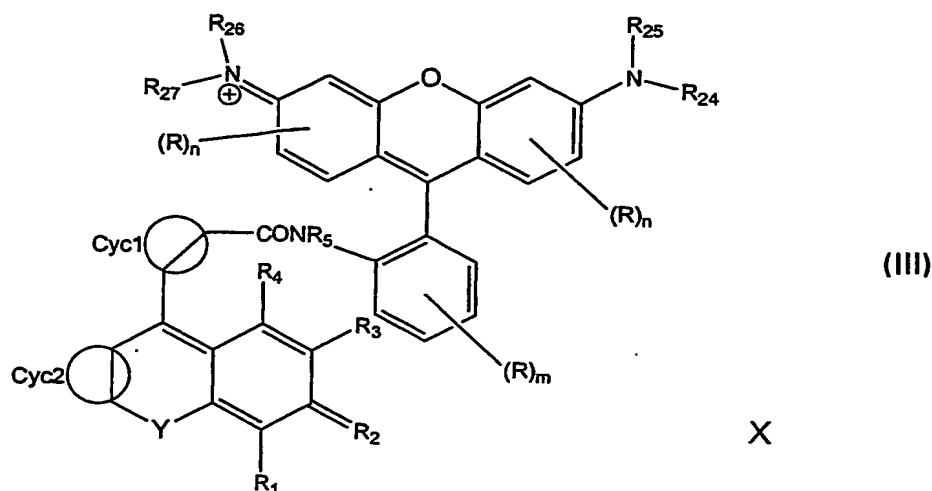
Farbstoffe, die der allgemeinen Formel (I) mit  $Y = -R_{14}$  und  $-R_{15}$  entsprechen, sind ebenfalls nützlich als Fluoreszenzquencher in der Analytik. Beispiele für solche Carboxamid-substituierten Triphenylmethan-Farbstoffe sind die erfindungsgemäßen Verbindungen 29 und 30 in Tabelle 1 (NK88, NK 89).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein multichromophores System, in welchem ein Carboxamid-substituierter Farbstoff gemäß der allgemeinen Formel (I) über  $R_5$  oder/und  $R_6$  an ein oder mehrere weitere Farbstoffmoleküle gekoppelt ist.

Vorzugsweise stellt das multichromophore System gemäß der Erfindung ein System dar, in welchem ein weiteres Farbstoffmolekül gemäß der allgemeinen Formel (I) an einen erfindungsgemäßen Carboxamid-substituierten Farbstoff gekoppelt ist. Ein Beispiel für ein solches bichromophores System ist Verbindung 59 in Tabelle 3 (NK69).

Es ist bevorzugt, dass die Kopplung an den oder die weiteren Carboxamid-substituierten Farbstoffe über jeweils den Rest  $R_5$  oder/und  $R_6$  erfolgt. Beispielsweise werden die Stickstoffatome der Carboxamidgruppe in den Farbstoffeinheiten über Alkylketten verknüpft.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des multichromophoren Systems gemäß der Erfindung ist ein bichromophores System der Formel (III).



worin die Reste wie oben definiert sind und  $R_{24}$ ,  $R_{25}$  und  $R_{26}$ ,  $R_{27}$  wie  $R_7$ ,  $R_8$  definiert sind, wobei  $n$  unabhängig 0, 1, 2 oder 3 und  $m$  0, 1, 2, 3 oder 4 bedeuten.

In den multichromophoren, insbesondere bichromophoren Systemen gemäß der vorliegenden Erfindung findet eine Energieübertragung (FRET) zwischen den Farbstoffmolekülen statt, wodurch bestimmte spektroskopische Eigenschaften erzielt werden können.

Die erfindungsgemäßen Carboxamid-substituierten Farbstoffe zeichnen sich insbesondere dadurch aus, dass sie die bei herkömmlichen Carboxylgruppen-substituierten Farbstoffen auftretende Lacton- bzw. Lactambildung nicht zeigen. Durch die Einführung der Carboxamid-Gruppe kann ferner erreicht werden, dass die Farbstoffmoleküle variabel funktionalisiert werden können, und somit für verschiedenste Anwendungen, wie analytische Verfahren, hervorragend geeignet sind. Überraschenderweise werden durch die Einführung der Carboxamid-Gruppe die sehr guten spektralen Eigenschaften der Ausgangsfarbstoffe, also die Absorptions- und Fluoreszenzbanden, die hohen Extinktionskoeffizienten sowie hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und Stabilität nicht wesentlich verändert. Bei einigen Farbstoffen wurde lediglich beobachtet, dass das

- 20 -

Absorptions- und Fluoreszenzmaximum der Farbstoffe um durchschnittlich 10 nm langwellig verschoben wird.

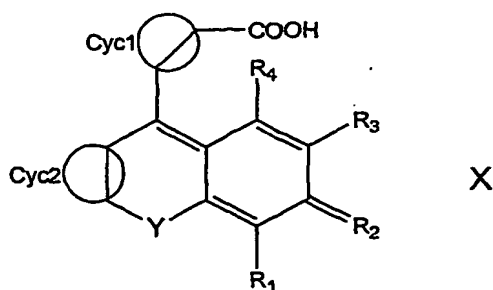
Des Weiteren wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, dass  
5 ein Farbstoff mit einer entsprechenden zur Lacton- bzw. Lactambildung  
neigenden Carboxylgruppe (Formel (II)) durch einfache Umsetzung eines  
zuvor aus der Carboxylgruppe gebildeten aktivierten Derivats des  
Farbstoffs mit einem sekundären Amin in gängigen Lösungsmitteln, wie  
Acetonitril oder DMF, zu dem gewünschten erfindungsgemäßen  
10 Carboxamid-substituierten Farbstoff der allgemeinen Formel (I) reagiert.  
Dabei ist erstaunlich, dass die Amid-Bildung selbst bei variierenden  
sterischen und elektronischen Verhältnissen in dem Farbstoff-Vorläufer in  
guten Ausbeuten verläuft. Insbesondere war nicht zu erwarten, dass sich  
Carboxylgruppen-enthaltende Farbstoffe, welche sich hinsichtlich der  
15 elektronischen Verhältnisse in dem Farbstoffmolekül wesentlich von  
Fluorescein-Derivaten unterscheiden, dennoch erfolgreich zu den  
erfindungsgemäßen Carboxamid-substituierten Farbstoffen umwandeln  
lassen.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren  
zur Herstellung von Carboxamid-substituierten Farbstoffen der allgemeinen  
Formel (I), umfassend die Schritte:

(a) Überführen der Carboxylgruppe eines Farbstoffs der allgemeinen  
Formel (II)

25

30



- 21 -

wobei die Reste wie oben angegeben definiert sind,  
in eine aktivierte Form;

- (b) Umsetzen des in Schritt (a) erhaltenen aktivierten Farbstoffs mit einem sekundären Amin  $\text{HNR}_5\text{R}_6$ ; und
- 5 (c) gegebenenfalls Isolieren des in Schritt (b) erhaltenen Carboxamid-substituierten Farbstoffs der allgemeinen Formel (I).

Die Aktivierung eines Carboxyl-enthaltenden Farbstoffs gemäß allgemeiner Formel (II) erfolgt vorzugsweise durch Überführen der Carboxyl-Gruppe in

10 einen Aktivester oder ein Säurechlorid. Die Aktivierung erfolgt mit gängigen, dem Fachmann wohl bekannten Verfahren. Im Allgemeinen werden zur Herstellung der Aktivester gebräuchliche Reagenzien, wie z.B. N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxynaphthalimid, O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronimtetrafluoroborat (TSTU)

15 verwendet. Vorzugsweise wird bei Temperaturen von 0 °C bis etwa 60 °C, mehr bevorzugt bei 10 °C bis 40 °C, am meisten bevorzugt bei 20 °C bis 30 °C, insbesondere bei Raumtemperatur, gearbeitet.

Insbesondere wird bei der Herstellung von aktivierten von Rhodamin

20 abgeleiteten Farbstoffen bei Raumtemperatur gearbeitet, um eine Zersetzung der Rhodamin-Derivate zu vermeiden. Die Reaktionszeiten variieren dabei je nach Struktur des Farbstoffes, im Allgemeinen ist die Reaktion jedoch nach etwa 5-48 Stunden, vorzugsweise 8-24 Stunden, abgeschlossen.

25

Die Umsetzung des in Schritt (a) erhaltenen aktivierten Farbstoffs erfolgt mit sekundären Aminen, welche die später im Carboxamid-substituierten Farbstoff der Formel (I) erwünschten Reste  $\text{R}_5$  und  $\text{R}_6$  enthalten. Die Umsetzung erfolgt vorzugsweise bei Raumtemperatur bis zu Temperaturen

30 von ungefähr 100 °C, vorzugsweise bei Temperaturen von etwa 50 °C bis 90 °C, mehr bevorzugt ungefähr 60 °C bis 80 °C. Dazu werden der Aktivester und das entsprechende sekundäre Amin in einem aprotischen

- 22 -

Lösungsmittel, wie z.B. Acetonitril, DMF, DMSO etc., gelöst und erhitzt (Carboxamid-Verfahren). Insbesondere muss bei der Synthese der erfindungsgemäß bevorzugten Carboxamid-substituierten Farbstoffe, die von Rhodamin abgeleitet sind, darauf geachtet werden, dass das Lösungsmittel wasserfrei ist, um eine Reaktion mit dem Aktivester zu vermeiden.

Die Amid-Bildung ist im Allgemeinen nach mehreren Stunden vollständig abgelaufen. Gegebenenfalls wird der in Schritt (b) erhaltene Carboxamid-substituierte Farbstoff durch dem Fachmann wohl bekannte Verfahren, wie z.B. Extrahieren, Filtrieren, säulenchromatographische Aufarbeitung, Destillation etc., aus der Reaktionsmischung isoliert.

Ein wesentlicher Vorteil des beschriebenen Verfahrens ist die uneingeschränkte Anwendbarkeit auf alle Farbstoffe der allgemeinen Formel (II), welche insbesondere über eine ortho-ständige bzw. aufgrund ihrer Position zur Lactonbildung neigende Carboxyl-Gruppe verfügen. Beispiele für einsetzbare Farbstoffklassen sind in Figur 1 aufgeführt. Dabei ist vor allem bemerkenswert, dass mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens auch Amino- und Imino- bzw. Iminiumgruppen-enthaltende Farbstoffe, wie z.B. Rhodamine, erfolgreich umgesetzt werden können.

Die entstehenden erfindungsgemäßen Farbstoffe sind besonders gut geeignet als Markierungsgruppen in analytischen Verfahren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung eines erfindungsgemäßen Carboxamid-Farbstoffes gemäß der allgemeinen Formel (I) zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten. Die erfindungsgemäßen Farbstoffe zeigen sowohl in chemischen als auch in medizinischen und biologischen Nachweisverfahren sehr gute Ergebnisse. Die Bestimmung kann beispielsweise in wässrigen Flüssigkeiten wie Körperflüssigkeiten, z.B. Blut, Serum, Plasma oder Urin,

- 23 -

Abwasserproben oder Lebensmitteln mit dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren durchgeführt werden. Dabei kann das Verfahren sowohl als Nasstest, z.B. in einer Küvette, oder als Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden. Die Bestimmung der  
5 Analyten kann dabei über eine einzige Reaktion oder durch eine Sequenz von Reaktionen erfolgen.

Zum Nachweis eines Analyten wird der Carboxamid-substituierte Farbstoff der Erfindung vorzugsweise an den Analyten oder/und einen Träger  
10 gekoppelt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Farbstoff an einen Bestandteil eines Nachweisreagenzes gekoppelt. Ein solcher Bestandteil ist vorzugsweise ein universaler Rezeptor oder ein Analytanalogon. Beispiele für derartige Bindepartner sind bevorzugt ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden,  
15 Nukleinsäuren, Nukleosiden, Nukleotiden, Nukleinsäure-Analoga und Haptenen.

Der Nachweis umfasst insbesondere einen immunologischen Nachweis oder/und einen Nukleinsäure-Hybridisierungs-Nachweis. Der  
20 nachzuweisende Analyt ist vorzugsweise ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden, Antikörpern, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga, Haptenen, Zellen, Zellbestandteilen, Viren, viralen Bestandteilen, Metaboliten, Hormonen, Neurotransmittern und Arzneimitteln.

25 Als Träger kann jedes geeignete Material ausgewählt werden, z.B. poröses Glas, Kunststoffe, Ionenaustauscher-Harze, Dextrane, Cellulose, Cellulosederivate und hydrophile Polymere.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Konjugat eines  
30 Bindepartners mit einem Carboxamid-substituierten Farbstoff gemäß Formel (I). Der Bindepartner ist dabei vorzugsweise ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleinsäuren, Nukleosiden, Nukleotiden, Nukleinsäure-



- 24 -

Analoga und Haptene. Die Konjugate können beispielsweise in Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren oder immunchemischen Verfahren verwendet werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold  
5 Spring Harbor.

Die Kopplung an den nachzuweisenden Analyten oder/und den Bestandteil eines Nachweisreagenzes oder/und den Träger erfolgt vorzugsweise über die Substituenten  $R_5$  oder/und  $R_6$  des Carboxamid-substituierten Farbstoffes  
10 der allgemeinen Formel (I). Besonders bevorzugt bildet sich eine kovalente Bindung aus. Insbesondere wird dies mittels der dem Fachmann wohl bekannten Aktivestermethode bewerkstelligt. Insbesondere geeignet dafür sind Carboxyl-Gruppen oder Substituenten mit Carboxyl-Gruppen als Reste  $R_5$  oder  $R_6$ . Eine solche Carboxyl-Gruppe ist ihrerseits wiederum aktivierbar  
15 und kann vorzugsweise für Kopplungen und Konjugatbildungen des erfindungsgemäßen Farbstoffs an Analyten, Bestandteile von Nachweisreagenzien oder Träger verwendet werden.

Beispielsweise setzt sich der aus dem Farbstoff NK 50 (Verbindung 1) hergestellte Succinimidylester (NHS-Ester) laut HPLC- bzw. DC-Analyse mit  
20 Benzylamin in Acetonitril innerhalb 30 Minuten vollständig zum entsprechenden Konjugat um. Auch mit Aminoethylmaleimid erhält man nach einigen Stunden eine vollständige Umsetzung zum Maleimid-Derivat. Diese Verbindung konnte wiederum erfolgreich mit N-Acetylcystein  
25 umgesetzt werden. Mit der beschriebenen Methode lassen sich aus der terminalen Carboxylgruppe alle gängigen Derivate herstellen, die z.B. zur Ankopplung an Amino- und Thiolgruppen von Biomolekülen verwendet werden.

30 Gegenüber herkömmlichen Farbstoffen weisen die erfindungsgemäßen Carboxamid-substituierten Farbstoffe den Vorteil auf, dass sie zwar über

- 25 -

eine aktivierbare Carboxyl-Gruppe verfügen, diese jedoch nicht zur Lacton- bzw. Lactambildung neigt.

5 Durch die folgenden Figuren und Beispiele soll die Erfindung näher erläutert werden.

### **Figuren**

10 In **Figur 1** sind Vertreter verschiedener Carboxyl-Gruppen enthaltender Farbstoffklassen aufgeführt, wobei die Substituenten weggelassen bzw. nicht näher bezeichnet sind.

15 In **Figur 2** sind erfindungsgemäße Carboxamid-substituierte Farbstoffe mit koppelbarer Carboxyl-Gruppe an  $R_5$  bzw.  $R_6$  mit den jeweiligen spektralen Daten (Absorptionsmaximum, Fluoreszenzmaximum und Fluoreszenzquantenausbeute) aufgeführt.

20 In **Figur 3** sind weitere Beispiele für erfindungsgemäße Carboxamid-substituierte Farbstoffe und deren spektrale Daten (Absorptionsmaximum, Fluoreszenzmaximum und Fluoreszenzquantenausbeute) angegeben.

In **Figur 4** sind erfindungsgemäße bichromophore Systeme aufgeführt.

25 **Figur 5** zeigt das Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum von Verbindung NK51 in Ethanol.

**Figur 6** zeigt das Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum von Verbindung NK56 in Ethanol.

30 **Figur 7** zeigt das Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum von Verbindung NK63 in Ethanol.

**Figur 8** zeigt das Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum von Verbindung NK65 in Ethanol.

### Beispiele

5

Die für das Carboxamidverfahren verwendeten Farbstoffe sind entweder kommerziell erhältlich oder nach literaturbekannten Synthesen oder dem Fachmann bekannten Verfahren darzustellen. Die verwendeten sekundären Amine sind ebenfalls in den meisten Fällen kommerziell erhältlich oder nach literaturbekannten Methoden zugänglich. Das bevorzugte Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Verbindungen ist exemplarisch anhand der Strukturen 1 (NK 50), 4 (NK 56), 51 (NK 67) und 18 (NK 79) beschrieben.

10

### Beispiel 1: Herstellung erfindungsgemäßer Verbindungen

15

#### Verbindung 1 (NK 50)

##### 1. Stufe: Rhodamin B-NHS-Ester

1 g (2,1 mmol) käufliches Rhodamin B (Chlorid) und 700 mg (2,4 mmol) O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TSTU) werden zusammen mit 700  $\mu$ l Hünigbase (N-Ethyl-diisopropylamin) in 50 ml trockenem Acetonitril aufgenommen und bei Raumtemperatur für etwa zwei Stunden verrührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Nach beendeter Umsetzung wird von wenig farblosem Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit 2 ml Perchlorsäure (60 %ig) versetzt. Durch zügiges Zutropfen von eiskalter 10 %iger Natriumperchloratlösung wird der Aktivester ausgefällt, abgesaugt, mit Eiswasser und Diethylether gewaschen und schließlich im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid scharf getrocknet.

25

30

Ausbeute: 0,8 g

ESI-Massenspektrum: m/z = 540,2

- 27 -

## 2. Stufe: NK 50

0,5 g (0,78 mmol) Rhodamin B-NHS-Ester (Perchlorat) und 0,25 g (1,56 mmol) 4-Methylaminobuttersäure-hydrochlorid werden in 40 ml Acetonitril suspendiert, mit 270  $\mu$ l Hünigbase versetzt und zum Rückfluss erhitzt. Die  
5 Reaktion wird dünnschichtchromatographisch kontrolliert und nach dem Verschwinden des NHS-Esters – in der Regel vier Stunden – abgebrochen. Die Reaktionsmischung wird zur Trockene eingeeengt und an neutralem Aluminiumoxid (Aktivität I) säulenchromatographisch gereinigt. Der Gradient des Elutionsmittels läuft von Ethanol zu Wasser. Die  
10 Farbstofffraktionen werden gesammelt und einrotiert. Der Rückstand wird zur Entfernung von 4-Methylaminobuttersäure-Resten in Chloroform gelöst und gegen mit Natriumchlorid gesättigtes Wasser ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wird getrocknet und einrotiert.

Ausbeute: 0,3 g

<sup>1</sup>H-NMR-Daten in DMSO-d<sub>6</sub>:

$\delta$  1,2 (T, 12H, -CH<sub>3</sub>); 1,6 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,6 (D, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,8 (S, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3,1 (D, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 3,6 (Qu, 8H, N-CH<sub>2</sub>-); 6,9 (S, 2H, ArH); 7,1 (M, 4H, ArH); 7,6 (M, 4H, ArH)

ESI-Massenspektrum: m/z = 542,2

Anhand des Farbstoffes NK 50 (Verbindung 1) konnte gezeigt werden, dass die gebildete sekundäre Amidbindung unter den gängigen physiologischen bzw. experimentellen Bedingungen stabil ist. Die Carboxamidbindung wird bei Raumtemperatur innerhalb von 24 Stunden  
25 und bei pH-Werten zwischen pH 3 und pH 11 nicht gespalten. Bei erhöhter Temperatur (100 °C) findet eine merkliche Spaltung erst im pH-Bereich oberhalb pH 11 statt.

**Verbindung 4 (NK 56)****1. Stufe: MR 33-NHS-Ester**

300 mg (0,69 mmol) MR 33 werden mit 157 mg (0,75 mmol)  
5 Dicyclohexylcarbodiimid und 87 mg (0,75 mmol) N-Hydroxy-succinimid in  
15 ml Acetonitril gelöst und bei Raumtemperatur für 24 Stunden verrührt.  
Die Reaktionsmischung wird filtriert und das Filtrat anschließend mit  
Diethylether versetzt. Der dabei entstehende Niederschlag wird abgesaugt  
und getrocknet.

10 Ausbeute: 80 mg

**2. Stufe: NK 56**

40 mg (0,075 mmol) MR 33-NHS-Ester werden zusammen mit 25 mg  
(0,15 mmol) 4-Methylaminobuttersäure-hydrochlorid und 30 µl Hünigbase  
15 in 20 ml Acetonitril gelöst und für etwa eine Stunde zum Rückfluss erhitzt.  
Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Nach  
Beendigung der Umsetzung wird zur Trockne einrotiert und der Rückstand  
an Kieselgel mit einem von Chloroform über Ethanol zu Wasser  
verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

20

**Verbindung 51 (NK 67)**

0,5 g (0,78 mmol) Rhodamin B-NHS-Ester (Perchlorat) und 0,3 g (1,56  
mmol) N-Methyl-D-glucamin werden in 20 ml Acetonitril gelöst und zum  
25 Rückfluss erhitzt. Die Isolierung des Produktes erfolgt  
säulenchromatographisch an Kieselgel mit Chloroform/Ethanol 9:1.

ESI-Massenspektrum:  $m/z = 620,3$

**Verbindung 18 (NK 136)****1. Stufe: NK 135**

11 g Resorcin (100 mmol) und 10,8 g Cyclohexandicarbonsäureanhydrid  
5 (Isomerengemisch, 70 mmol) werden gemischt, fein gemörsert und auf  
dem Ölbad bei etwa 180 °C aufgeschmolzen. Im Verlauf der Reaktion wird  
die Schmelze fest. Die Reaktion ist nach ca. 4 Stunden beendet. Nach dem  
Erkalten wird der Feststoff zermörsert und mit Wasser ausgekocht,  
abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen.

10

Das rohe Produkt kann für die nächste Stufe ohne Reinigung eingesetzt  
werden. Zur weiteren Reinigung kann das Produkt in verdünnter  
Natronlauge aufgelöst und mit halbkonzentrierter Schwefelsäure wieder  
ausgefällt werden.

15

**2. Stufe: NK 135-NHS-Ester**

100 mg (0,3 mmol) NK 135 werden in 10 ml Acetonitril unter Zusatz von  
etwa 100 µl DMF und 0,5 ml 20 %iger wässriger  
Tetraethylammoniumhydroxidlösung gelöst und mit 72 mg (0,35 mmol)  
20 Dicyclohexylcarbodiimid und 40 mg (0,35 mmol) N-Hydroxysuccinimid  
versetzt. Die Lösung wird für 12 Stunden bei Raumtemperatur verrührt,  
dann im Vakuum bei etwa 40 °C zur Hälfte eingeeengt, filtriert und  
anschließend wird durch Zugabe von Wasser ein Feststoff ausgefällt. Das  
Rohprodukt wird abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum  
25 über Phosphorpentoxid getrocknet. Der Feststoff enthält auch nicht  
umgesetztes Edukt.

**3. Stufe: NK 136**

100 mg des so erhaltenen Feststoffs werden mit 200 mg  
30 4-Methylaminobuttersäure-hydrochlorid in 10 ml Acetonitril suspendiert und  
mit 250 µl Hünigbase für drei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die  
Reaktionslösung wird zur Trockne einrotiert und an Kieselgel mit einem von

- 30 -

Chloroform zu Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch isoliert. Die letzte farbige Zone enthält das gewünschte Produkt.

ESI-Massenspektrum:  $m/z = 434,1$

## 5 Beispiel 2: Beispiele zur Konjugatbildung

### NK 50-NHS-Ester

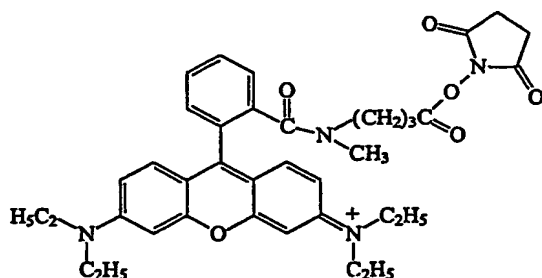
0,5 g (0,78 mmol) NK 50-Perchlorat werden in 20 ml trockenem Acetonitril  
10 gelöst, mit 250 mg (0,85 mmol) TSTU und 170  $\mu$ l (1 mmol) Hünigbase  
versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wird  
die Lösung im Vakuum auf etwa ein Viertel eingeeengt, mit 1 ml 60 %iger  
Perchlorsäure versetzt und durch Zutropfen von 20 %iger  
Natriumperchloratlösung der Farbstoff ausgefällt. Der Feststoff wird  
15 abgesaugt, gründlich mit Wasser und Diethylether gewaschen und im  
Vakuum über Phosphorpentoxid im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,4 g

ESI-Massenspektrum:  $m/z = 639,3$

20

25

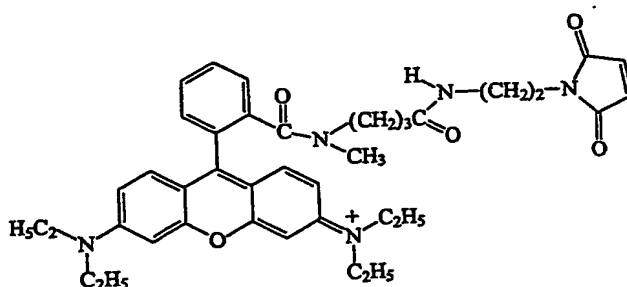


30

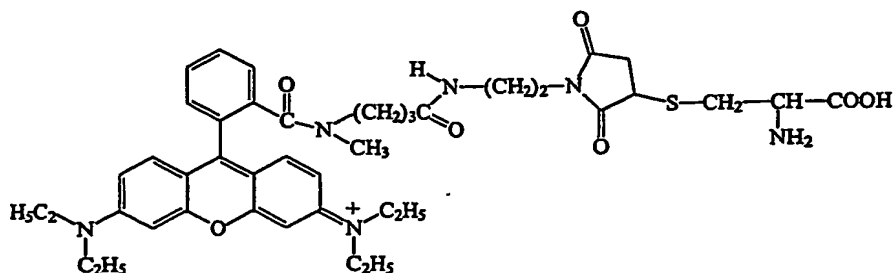
- 31 -

**NK 50-Aminoethyl-maleinimid**

0,1 mmol NK 50-NHS-Ester werden in 5 ml trockenem Acetonitril gelöst, mit 0,15 mmol Aminoethyl-maleinimid und 30  $\mu$ l Hünigbase versetzt. Die Lösung wird für 5 Stunden bei Raumtemperatur verrührt, filtriert und in Diethylether getropft. Der so erhaltene Niederschlag wird im Ölpumpenvakuum getrocknet.

**NK 50-Aminoethyl-maleinimid-Cystein-Konjugat**

0,1 mmol NK 50-Aminoethyl-maleinimid werden in 20 ml Ethanol gelöst und portionsweise mit insgesamt 0,15 mmol Cystein versetzt. Man verrührt bei Raumtemperatur und tropft nach etwa 2 Stunden ca. 50 ml einer 10 %igen Natriumperchloratlösung hinzu. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

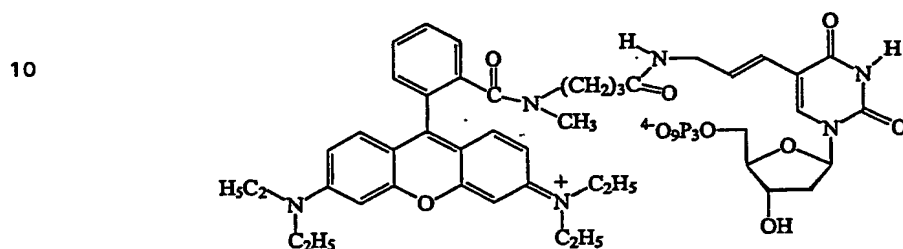




- 32 -

**NK 50-dUTP-Konjugat**

10  $\mu$ mol 5-(3-Aminoallyl)-dUTP werden in 0,5 ml 0,1 M Natriumborat-Puffer (pH 8) gelöst und mit einer Lösung von 5  $\mu$ mol NK 50-Aktivester in 1 ml aminfreiem N,N-Dimethylformamid versetzt. Die  
5 Lösung wird 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand chromatographisch gereinigt.



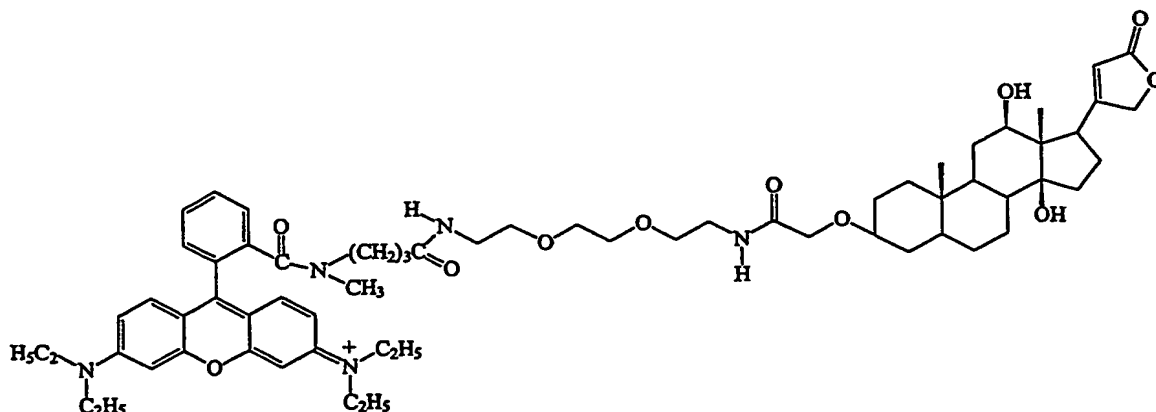
15

**NK 50-Digoxin-3-Carboxymethylether-Diaminodioxaoctan-Konjugat (Dig-CME-DADOO)**

20

0,02 mmol NK 50-Aktivester werden mit 0,02 mmol Dig-CME-DADOO in Acetonitril für 18 Stunden bei Raumtemperatur verrührt. Die Lösung wird eingeeengt und der Rückstand chromatographisch gereinigt.

25

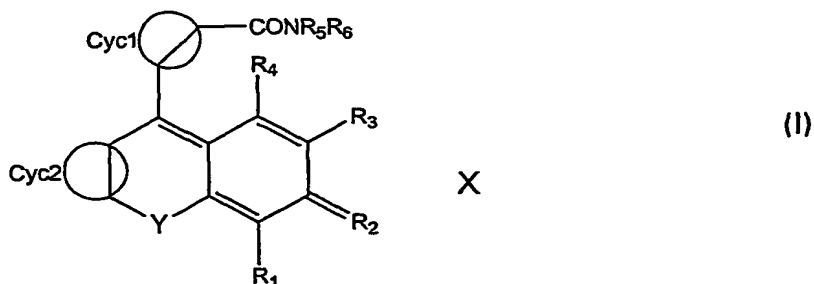


# Ansprüche

## 1. Carboxamid-substituierter Farbstoff der allgemeinen Formel (I)

5

10



wobei

15

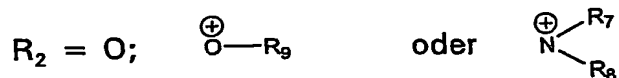
Y = Sauerstoff, Schwefel, Selen,  $CR_aR_b$ ,  $NR_c$ , eine direkte Verknüpfung oder  $-R_{14}$  und  $-R_{15}$  darstellt;

20

$R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  unabhängig Wasserstoff, Halogen,  $-O^\ominus$ , eine Hydroxygruppe, Thiolgruppe, Aminogruppe, Ammoniumgruppe, Sulfogruppe, Phosphogruppe, Nitrogruppe, Carbonylgruppe, Carboxygruppe, ein Carbonsäurederivat, eine Nitrilgruppe, Isonitrilgruppe, Cyanatgruppe, Isocyanatgruppe, Thiocyanatgruppe, Iosthiocyanatgruppe oder eine geradkettige, verzweigte oder cyclische gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 40 Kohlenstoffatomen darstellen;

25

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$  und  $R_{14}$ ,  $R_{15}$  unabhängig die gleichen Bedeutungen haben, wie es für  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  definiert ist;



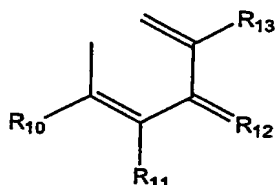
30

darstellt, wobei

- 34 -

$R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$  unabhängig Wasserstoff oder eine geradkettige, verzweigte oder cyclische gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 40 Kohlenstoffatomen darstellen; oder

5  $R_1$  zusammen mit  $R_2$

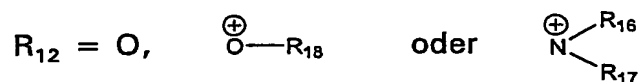


10

darstellt, wobei

$R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{13}$  die gleichen Bedeutungen haben, wie es für  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  definiert ist;

15



darstellt, wobei

20

$R_{16}$ ,  $R_{17}$ ,  $R_{18}$  die gleichen Bedeutungen aufweisen, wie es für  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$  definiert ist;

$R_5$ ,  $R_6$  unabhängig eine geradkettige, verzweigte oder cyclische gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 40 Kohlenstoffatomen darstellen;

25

Cyc1 einen organischen Rest darstellt, der ein Ringsystem umfasst, ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden und cycloaliphatischen Ringen;

30

Cyc2 einen organischen Rest darstellt, der ein Ringsystem umfasst, ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden und cycloaliphatischen Ringen;

- 35 -

wobei jeder der Reste in dem Farbstoff der Formel (I) mit einem oder mehreren benachbarten Resten ein Ringsystem bilden kann;  
 und X, wenn es zum Ladungsausgleich erforderlich ist, ein oder mehrere ein- oder mehrwertige Anionen darstellt;  
 mit der Maßgabe, dass in der allgemeinen Formel (I) nicht gleichzeitig

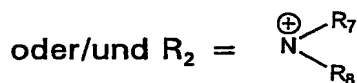
- Y = Sauerstoff,
- Cyc1 = Phenyl oder substituiertes Phenyl,
- Cyc2 = Hydroxy-, Ether- oder Ester-substituiertes Phenyl

und

- $R_2 = O$

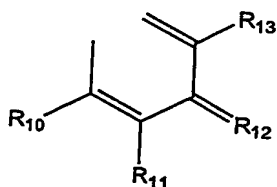
darstellen.

2. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 1, wobei Cyc2 einen Stickstoff-enthaltenden Heterocyclus oder ein Ringsystem darstellt, welches mit mindestens einer Aminogruppe substituiert ist

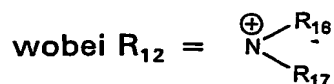


darstellt oder

zusammen mit  $R_1 =$



darstellt,

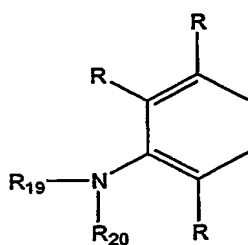


ist, wobei  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{13}$  und  $R_{16}$ ,  $R_{17}$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

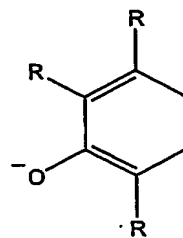
3. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 1 oder 2, wobei Cyc2 in Formel (I) eine Struktur (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H) oder (J) aufweist,

5

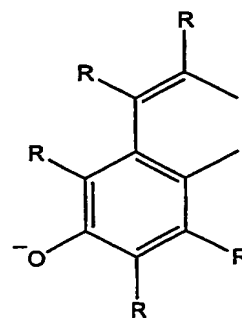
10



(A)

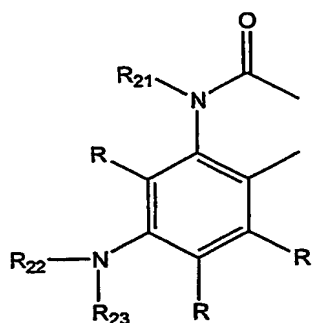


(B)

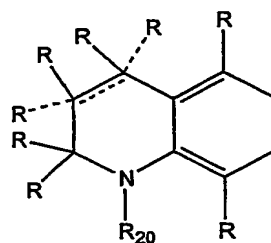


(C)

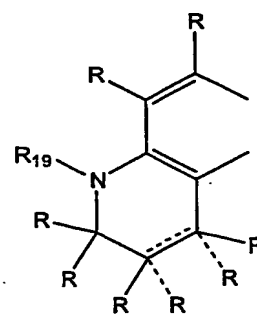
15



(D)

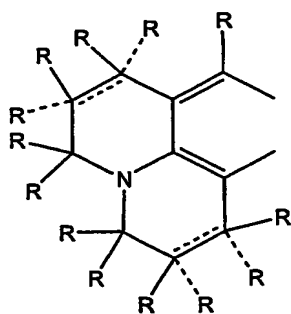


(E)

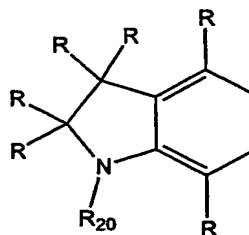


(F)

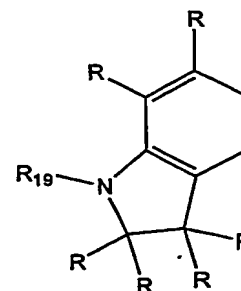
25



(G)



(H)



(J)

30

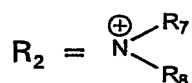
- 37 -

wobei R jeweils unabhängig wie R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> in Anspruch 1 definiert ist; R<sub>19</sub>, R<sub>20</sub> und R<sub>22</sub>, R<sub>23</sub> unabhängig wie R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> in Anspruch 1 definiert sind; und

R<sub>21</sub> wie R<sub>7</sub> in Anspruch 1 definiert ist und die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten, bei deren Vorhandensein die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste fehlen.

4. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Cyc1 substituiertes oder unsubstituiertes Phenyl, Naphthyl, Pyridyl oder Cyclohexyl darstellt.

5. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei

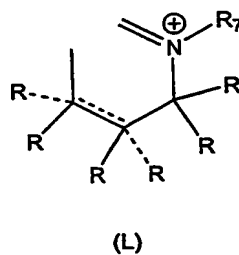
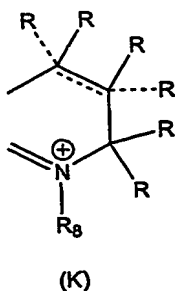


darstellt, worin R<sub>7</sub> und R<sub>8</sub> wie in Anspruch 1 definiert sind.

6. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 5, wobei R<sub>1</sub> mit R<sub>8</sub> oder/und R<sub>3</sub> mit R<sub>7</sub> verbrückt ist und ein Ringsystem bildet.

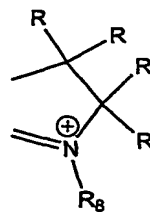
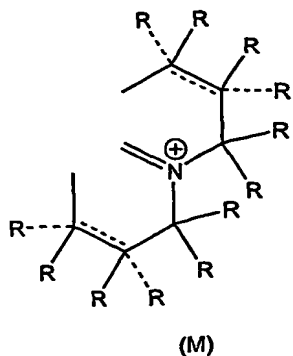
7. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 6, wobei das oder die Ringsystem/e 5- oder 6-gliedrige Ringe enthalten.

8. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 7, wobei ein Ringsystem der Struktur (K), (L), (M), (N) oder (O) gebildet wird:

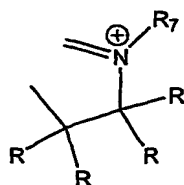


- 38 -

5



10



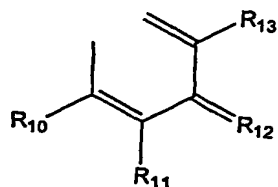
15

wobei R jeweils unabhängig wie R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> wie in Anspruch 1 definiert sind,  
und die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten, bei deren Vorhandensein die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste fehlen.

20

9. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei  
R<sub>2</sub> zusammen mit R<sub>1</sub>

25



30

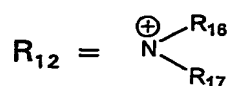
darstellt, worin R<sub>10</sub> - R<sub>13</sub> wie in Anspruch 1 definiert sind.

- 39 -

10. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 9, wobei  $R_{12} = O$  darstellt.

11. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 9, wobei

5



darstellt, worin  $R_{16}$  und  $R_{17}$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

10 12. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  $Y = \text{Sauerstoff}$  darstellt.

13. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei  $Y = \text{Schwefel, Selen oder } CR_aR_b$  darstellt, wobei  $R_a$  und  $R_b$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

15

14. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei  $Y = \text{die Reste } -R_{14} \text{ und } -R_{15}$  darstellt, wobei  $R_{14}$  und  $R_{15}$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

20

15. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 8, wobei Cyc1 gegebenenfalls substituiertes Phenyl ist, Cyc2 die Struktur (E) aufweist und  $Y = \text{Sauerstoff}$  ist und  $R_7$  und  $R_3$  ein Ringsystem (K) bilden,  $R_7$  und  $R_3$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

25

16. Carboxamid-substituierter Farbstoff nach Anspruch 8, wobei Cyc1 gegebenenfalls substituiertes Phenyl ist, Cyc2 die Struktur (A) aufweist und  $Y = \text{Schwefel, Selen oder } CR_aR_b$  darstellt, wobei  $R_a$  und  $R_b$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

30



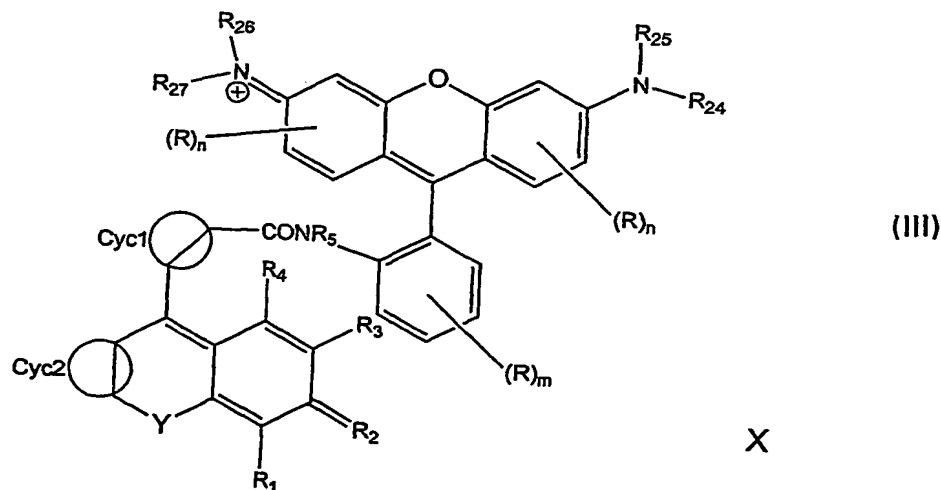
- 40 -

17. Multichromophores System, in welchem ein Carboxamid-substituierter Farbstoff gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 über  $R_5$  oder/und  $R_6$  an ein oder mehrere weitere Farbstoffmoleküle gekoppelt ist, wobei  $R_5$  und  $R_6$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

18. Multichromophores System nach Anspruch 17, wobei die ein oder mehreren weiteren Farbstoffmoleküle Carboxamid-substituierte Farbstoffe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 sind.

19. Multichromophores System nach Anspruch 18, wobei die Kopplung an  $R_5$  oder/und  $R_6$  der weiteren Carboxamid-substituierten Farbstoffe erfolgt, wobei  $R_5$  und  $R_6$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

20. Multichromophores System nach Anspruch 17 der Formel (III)



worin die Reste wie in Anspruch 1 definiert sind, R jeweils unabhängig wie  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  und  $R_{24}$ ,  $R_{25}$  und  $R_{26}$ ,  $R_{27}$  wie  $R_7$ ,  $R_8$  in Anspruch 1 definiert sind, wobei n unabhängig 0, 1, 2 oder 3 und m 0, 1, 2, 3 oder 4 bedeuten.

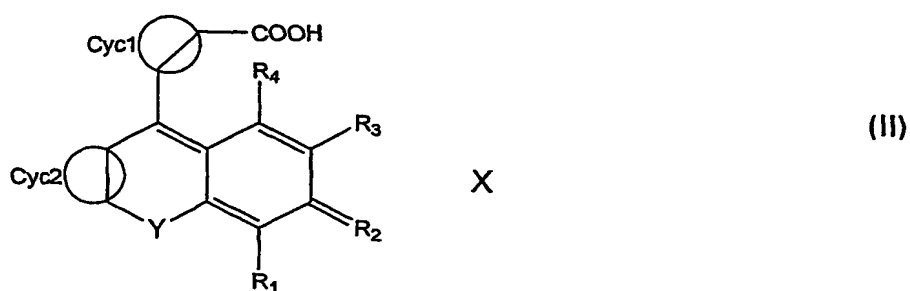
- 41 -

21. Verfahren zur Herstellung von Carboxamid-substituierten Farbstoffen der allgemeine Formel (I) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, umfassend die Schritte:

- (a) Überführen der Carboxylgruppe eines Farbstoffs der allgemeine Formel (II)

5

10



15

wobei die Reste wie in Anspruch 1 angegeben definiert sind, in eine aktivierte Form;

- (b) Umsetzen des in Schritt (a) erhaltenen aktivierten Farbstoffs mit einem sekundären Amin  $\text{HNR}_5\text{R}_6$ ; und
- (c) gegebenenfalls Isolieren des in Schritt (b) erhaltenen Carboxamid-substituierten Farbstoffs der allgemeinen Formel (I).

20

25

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei Schritt (a) bei Temperaturen von Raumtemperatur bis 60 °C durchgeführt wird.

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, wobei in Schritt (b) ein aprotisches Lösungsmittel verwendet wird.

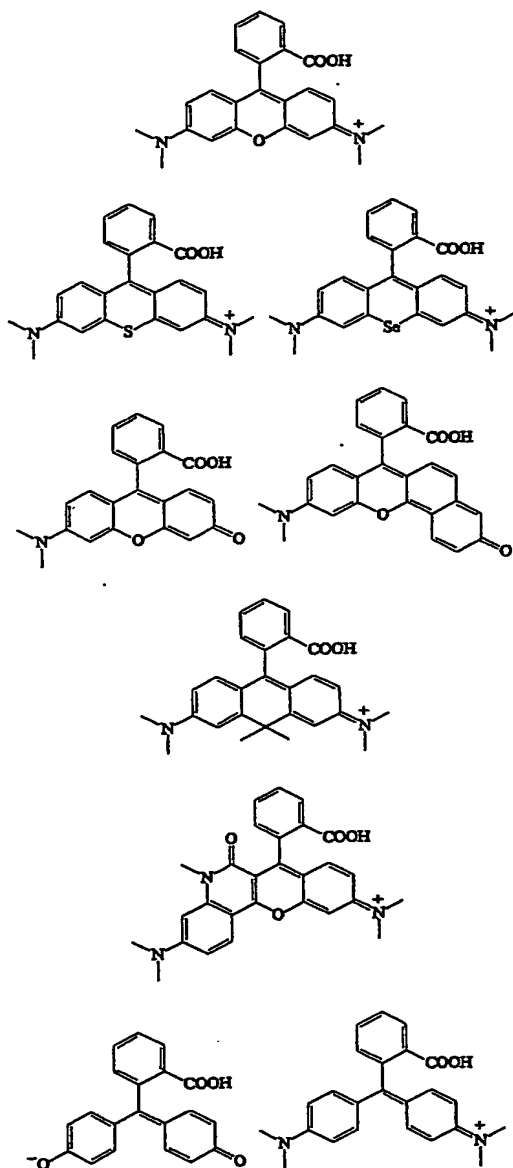
30

- 42 -

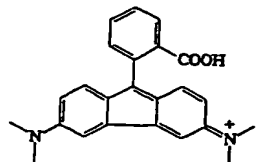
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 23, wobei zur Aktivierung N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxynaphthalimid, O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronimtetrafluoroborat (TSTU) verwendet wird.
- 5 25. Verwendung eines Carboxamid-Farbstoffes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten.
- 10 26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei der Carboxamid-substituierte Farbstoff der allgemeinen Formel (I) an den nachzuweisenden Analyten oder/und an einen Bestandteil eines Nachweisreagenzes oder/und einen Träger gekoppelt wird.
- 15 27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26, wobei der Nachweis einen immunologischen Nachweis oder/und einen Nukleinsäure-Hybridisierungs-Nachweis umfasst.
- 20 28. Konjugat aus einem Carboxamid-substituierten Farbstoff der allgemeinen Formel (I) nach einem der Ansprüche 1 bis 16 und einem Bindepartner.
- 25 29. Konjugat nach Anspruch 28, wobei der Bindepartner ausgewählt ist aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleinsäuren, Nukleosiden, Nukleotiden, Nukleinsäure-Analoga und Haptenen.
30. Verwendung eines Konjugats gemäß Anspruch 28 oder 29 in Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren und immunochemischen Verfahren.

- 43 -

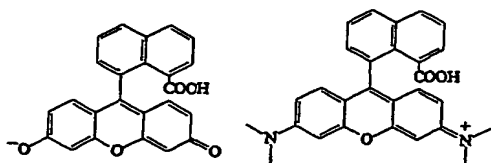
31. Verwendung nach Anspruch 26 oder 27, wobei die Kopplung an den nachzuweisenden Analyten oder/und den Bestandteil eines Nachweisreagenz oder/und den Träger über die Substituenten  $R_5$  oder/und  $R_6$  des Carboxamid-substituierten Farbstoffs der allgemeinen Formel (I) erfolgt, wobei die Reste  $R_5$  und  $R_6$  wie in Anspruch 1 definiert sind.
32. Verwendung nach Anspruch 31 wobei die Kopplung über eine kovalente Bindung erfolgt.

**Figur 1****Rhodamine****Thiorhodamine, Selenorhodamine****Rhodol-Farbstoffe****Carbopyronine****Amidopyrylium-Farbstoffe****Triphenylmethan-Farbstoffe**

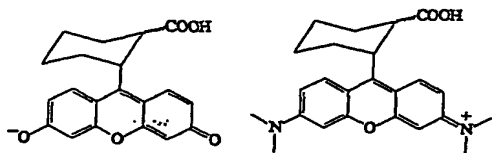
Figur 1 (Fortsetzung)



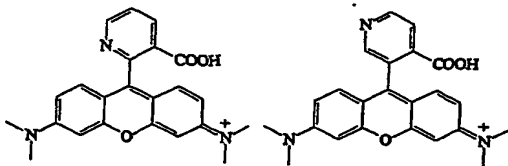
Fluorenabkömmlinge



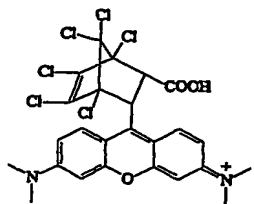
aus Naphthalsäureanhydrid



aus Cyclohexandicarbonsäureanhydriden



aus Pyridindicarbonsäureanhydriden



aus 1,4,5,6,7,7,-Hexachlor-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureanhydrid



Figur 2 (Fortsetzung)

6 NK 58		562	586	46
7 NK 59		535	565	92
8 NK 60		584	605	34
9 NK 61		625	655	89
10 NK 62		565, s 623, b	650, b	40
11 NK 63		615	680	10
12 NK 64		614	677	9



Figur 2 (Fortsetzung)

13 NK 65		618	650	66
14 NK 66		618	648	65
15 NK 76		563	586	46
16 NK 77		561	585	48
17 NK 78		619	644	69
18 NK 436		512, b	530, b	85
19 NK 106		530	556	20

Figur 2 (Fortsetzung)

20 NK 80		645, b	700, b	16
21 NK 81		520, b	545, b	80
22 NK 82		624	644	89
23 NK 83		496	519	80
24 NK 107		552	-	0,5
25 NK 84		573	595	92

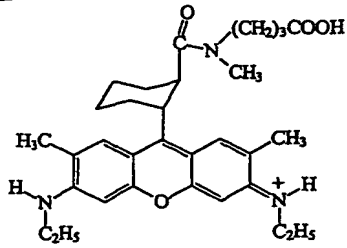
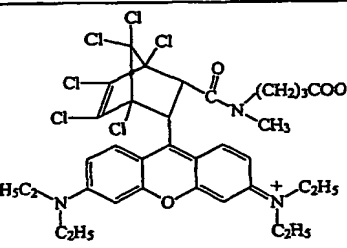
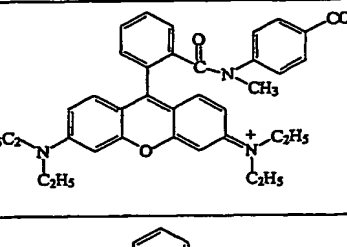
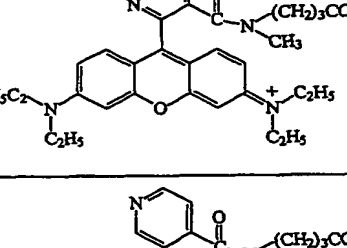
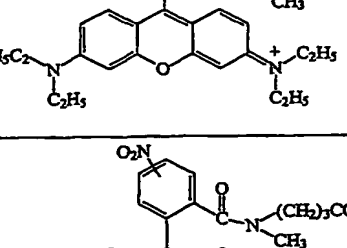
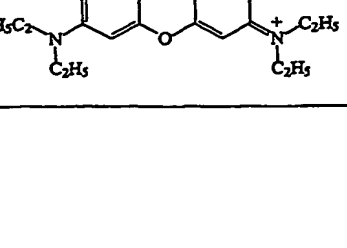
Figur 2 (Fortsetzung)

26 NK 85		601	627	88
27 NK 86		575	600	45
28 NK87		580	-	0
29 NK 88		570, b	-	0
30 NK 89		640	-	0
31 NK 90		565	590	55
32 NK 108		538	560	90

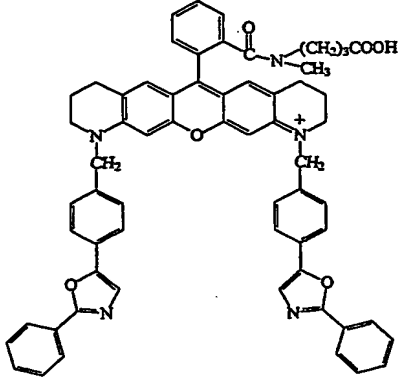
### Figur 2 (Fortsetzung)

33 NK 91		575	605	35
34 NK 92		585	615	30
35 NK 109		562	594	80
36 NK 93		581	610	30
37 NK 94		558	580	48
38 NK 95		558	580	48

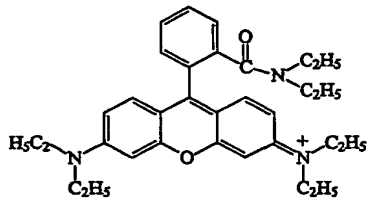
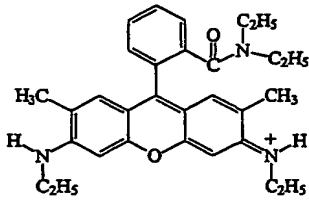
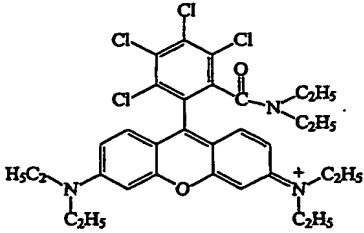
Figur 2 (Fortsetzung)

39 NK 110		533	560	87
40 NK 96		570	597	45
41 NK 99		556	578	35
42 NK 102		562	590	45
43 NK 103		562	590	45
44 NK 104		557	575	1

**Figur 2 (Fortsetzung)**

<p>45 NK 105</p>		<p>573</p>	<p>596</p>	<p>92</p>
----------------------	--	------------	------------	-----------

**Figur 3****Spektrale Daten in Ethanol** $\lambda_a$ : Absorptionsmaximum $\lambda_f$ : Fluoreszenzmaximum $\eta_f$ : Fluoreszenzquantenausbeute

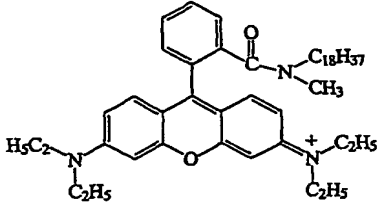
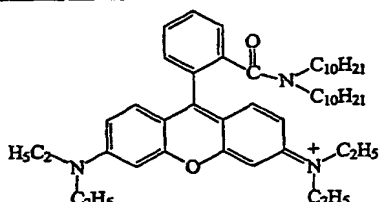
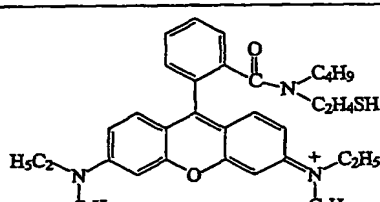
	Struktur	$\lambda_a$ / nm	$\lambda_f$ / nm	$\eta_f$ / %
46 NK 47		563	588	47
47 NK 48		536	565	92
48 NK 52		585	607	34

Figur 3 (Fortsetzung)

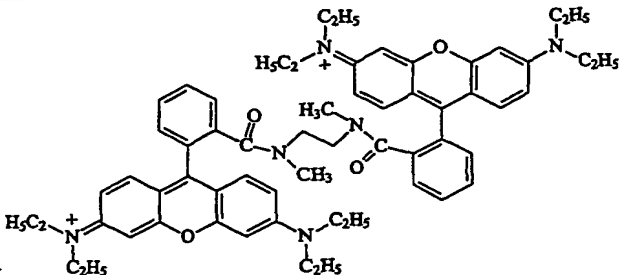
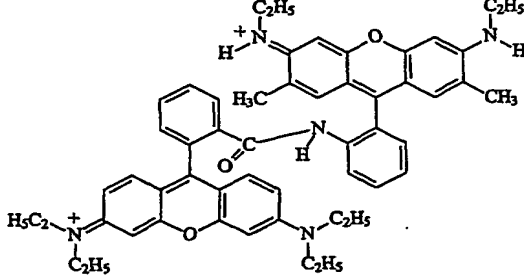
49 NK 53		626	648	87
50 NK 55		562, s 623, b	650, b	40
51 NK 67		561	585	46
52 NK 68		563	585	47
53 NK 70		563	584	46
54 NK 71		559	583	45
55 NK 97		562	586	47



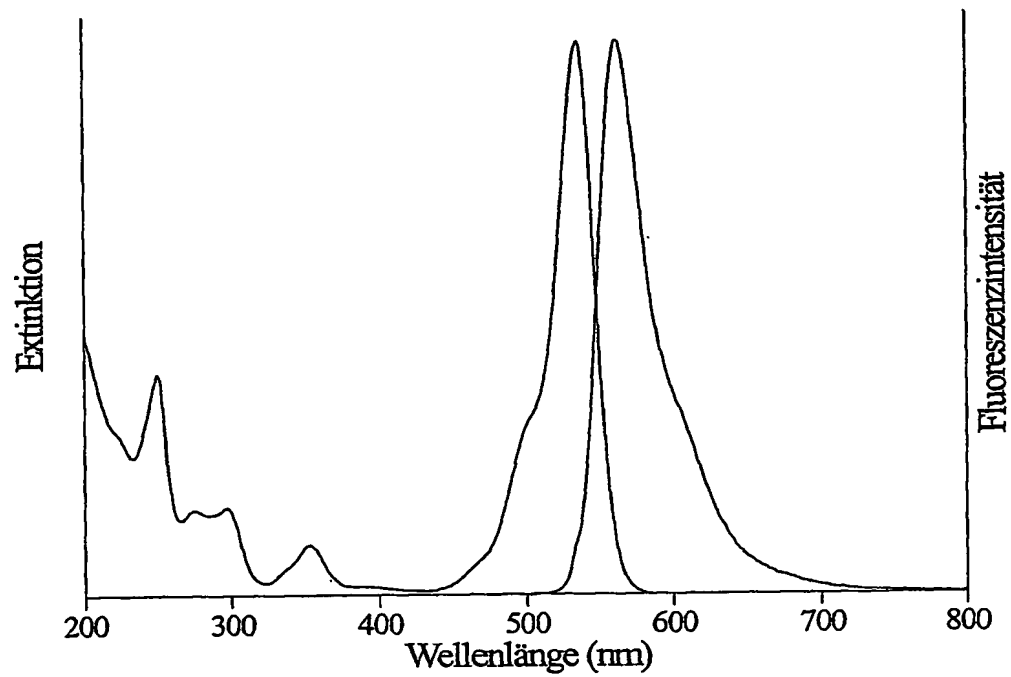
Figur 3 (Fortsetzung)

56 NK 98		563	586	48
57 NK 100		562	585	48
58 NK 101		562	585	48

Figur 4

	Struktur
59 NK 69	
60 NK 72	

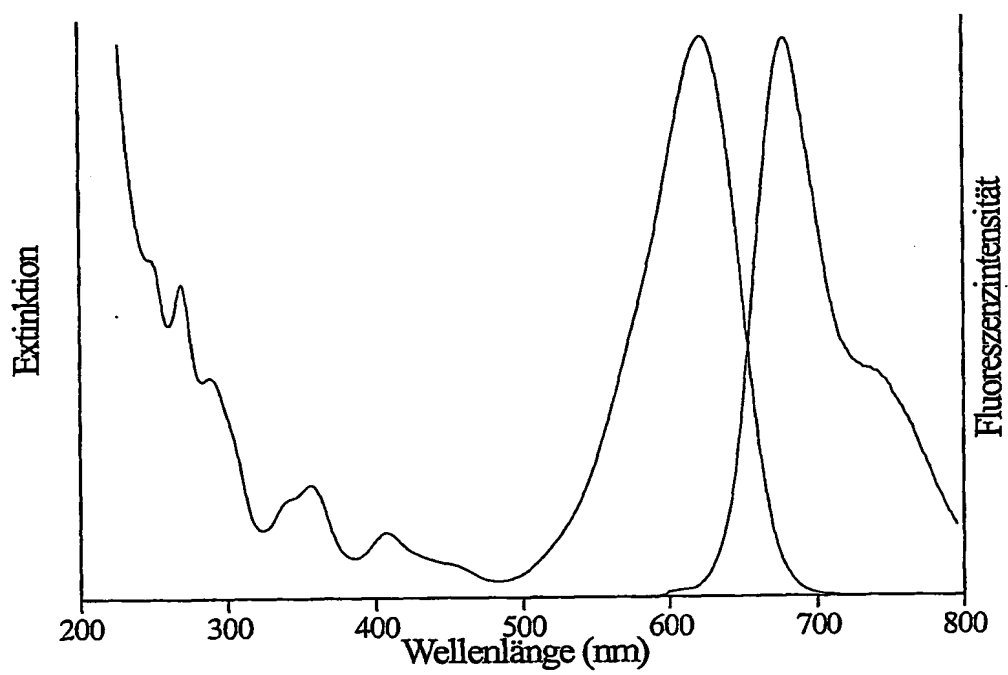
15/18

**Figur 5****NK 51**

16/18

Figur 6

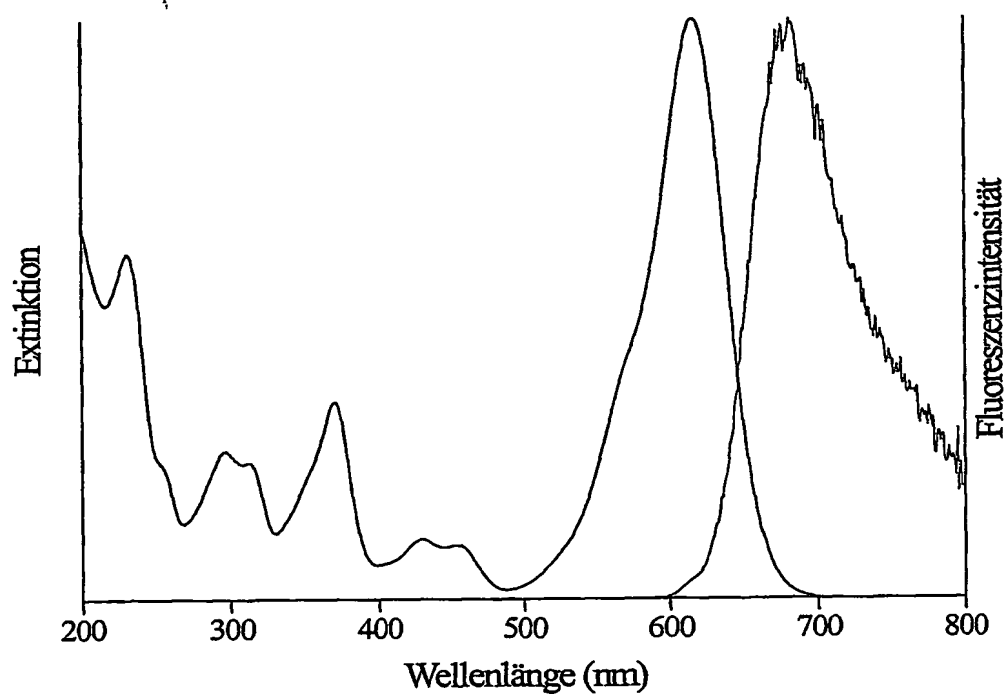
NK 56



17/18

Figur 7

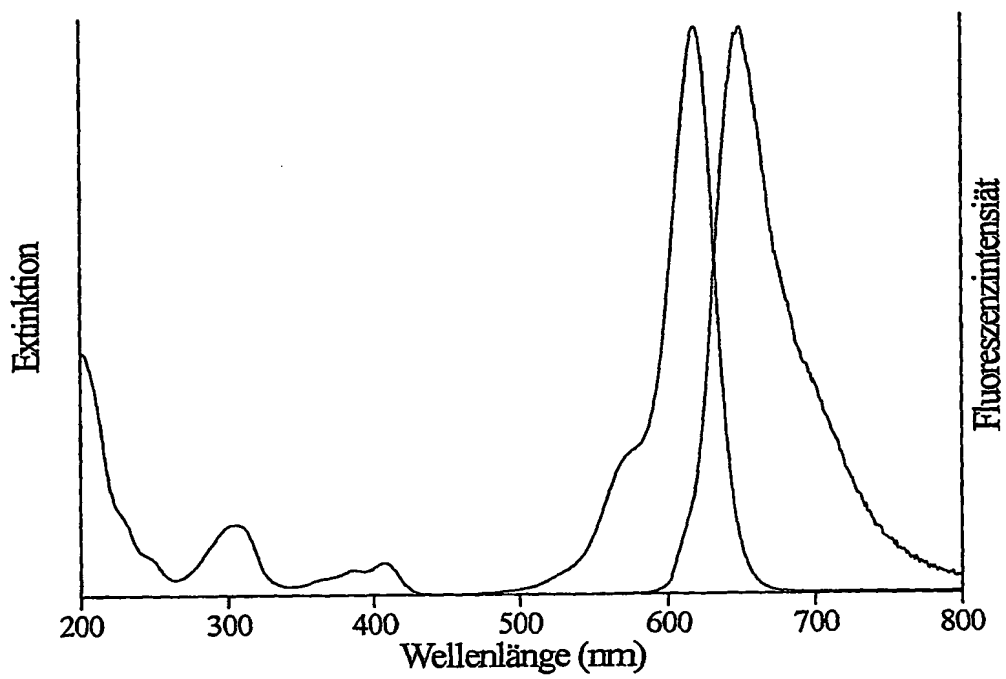
NK 63



18/18

Figur 8

NK 65



**Feld Nr. VIII (iv) ERKLÄRUNG: ERFINDERERKLÄRUNG (nur im Hinblick auf die Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika)**

*Die Erklärung muß dem in Abschnitt 214 vorgeschriebenen Wortlaut entsprechen; siehe Anmerkungen zu den Feldern VIII, VIII (i) bis (iv) (allgemein) und insbesondere die Anmerkungen zum Feld Nr. VIII (iv). Wird dieses Feld nicht benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.*

**Erfindererklärung (Regeln 4.17 Ziffer iv und 51bis.1 Absatz a Ziffer iv)  
im Hinblick auf die Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika:**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich nach bestem Wissen der ursprüngliche, erste und alleinige Erfinder (falls nachstehend nur ein Erfinder angegeben ist) oder Miterfinder (falls nachstehend mehr als ein Erfinder angegeben ist) des beanspruchten Gegenstandes bin, für den ein Patent beantragt wird.

Diese Erklärung wird im Hinblick auf und als Teil dieser internationalen Anmeldung abgegeben (falls die Erklärung zusammen mit der Anmeldung eingereicht wird).

Diese Erklärung wird im Hinblick auf die internationale Anmeldung Nr. PCT/..... abgegeben (falls diese Erklärung nach Regel 26ter eingereicht wird).

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß mein Wohnsitz, meine Postanschrift und meine Staatsangehörigkeit den neben meinem Namen aufgeführten Angaben entsprechen.

Ich bestätige hiermit, daß ich den Inhalt der oben angegebenen internationalen Anmeldung, einschließlich ihrer Ansprüche, durchgesehen und verstanden habe. Ich habe im Antragsformular dieser internationalen Anmeldung gemäß PCT Regel 4.10 sämtliche Auslandsanmeldungen angegeben und habe nachstehend unter der Überschrift "Frühere Anmeldungen", unter Angabe des Aktenzeichens, des Staates oder Mitglieds der Welthandelsorganisation, des Tages, Monats und Jahres der Anmeldung, sämtliche Anmeldungen für ein Patent bzw. eine Erfindurkunde in einem anderen Staat als den Vereinigten Staaten von Amerika angegeben, einschließlich aller internationalen PCT-Anmeldungen, die wenigstens ein anderes Land als die Vereinigten Staaten von Amerika bestimmen, deren Anmeldetag dem der Anmeldung, deren Priorität beansprucht wird, vorangeht.

Frühere Anmeldungen: DE - 102.59.374.4 - 18.12.2002.....

Ich erkenne hiermit meine Pflicht zur Offenbarung jeglicher Informationen an, die nach meinem Wissen zur Prüfung der Patentfähigkeit in Einklang mit Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56 von Belang sind, einschließlich, im Hinblick auf Teilfortsetzungsanmeldungen, Informationen, die im Zeitraum zwischen dem Anmeldetag der früheren Patentanmeldung und dem internationalen PCT-Anmeldedatum der Teilfortsetzungsanmeldung bekannt geworden sind.

Ich erkläre hiermit, daß alle in der vorliegenden Erklärung von mir gemachten Angaben nach bestem Wissen und Gewissen der Wahrheit entsprechen, und ferner, daß ich diese eidesstattliche Erklärung in Kenntnis dessen ablege, daß wissentlich und vorsätzlich falsche Angaben oder dergleichen gemäß § 1001, Title 18 des US-Codes strafbar sind und mit Geldstrafe und/oder Gefängnis bestraft werden können und daß derartige wissentlich und vorsätzlich falsche Angaben die Rechtswirksamkeit der vorliegenden Patentanmeldung oder eines aufgrund deren erteilten Patentes gefährden können.

Name: ARDEN-JACOB, Jutta.....

Wohnsitz: DE.....  
(Stadt und US-Staat, falls anwendbar, sonst Land)

Postanschrift: Am Hügel 25.....  
D-90513 Zirndorf.....

Staatsangehörigkeit: DE.....

Unterschrift des Erfinders: J. Arden-Jacob..... Datum: 29.01.2004.....  
(falls nicht bereits das Antragsformular unterschrieben wird oder falls die Erklärung nach Einreichung der internationalen Anmeldung nach Regel 26ter berichtigt oder hinzugefügt wird. Die Unterschrift muß die des Erfinders sein, nicht die des Anwalts) (der Unterschrift, falls das Antragsformular nicht unterschrieben wird oder der Erklärung, die nach Regel 26ter nach Einreichung der internationalen Anmeldung berichtigt oder hinzugefügt wird)

Name: DREXHAGE, Karl-Heinz.....

Wohnsitz: DE.....  
(Stadt und US-Staat, falls anwendbar, sonst Land)

Postanschrift: Schanzenweg 50.....  
D-57076 Siegen.....

Staatsangehörigkeit: DE.....

Unterschrift des Erfinders: K. H. Drexhage..... Datum: March 26, 2004.....  
(falls nicht bereits das Antragsformular unterschrieben wird oder falls die Erklärung nach Einreichung der internationalen Anmeldung nach Regel 26ter berichtigt oder hinzugefügt wird. Die Unterschrift muß die des Erfinders sein, nicht die des Anwalts) (der Unterschrift, falls das Antragsformular nicht unterschrieben wird oder der Erklärung, die nach Regel 26ter nach Einreichung der internationalen Anmeldung berichtigt oder hinzugefügt wird)

☒ Diese Erklärung wird auf dem folgenden Blatt fortgeführt, "Fortsetzungsblatt für Feld Nr. VIII (iv)".

## Fortsetzungsblatt für Felder VIII (i) bis (v) ERKLÄRUNG

Falls der Platz in einem der Felder VIII (i) bis (v) nicht für alle Angaben ausreicht, insbesondere im Falle, daß mehr als zwei Erfinder in Feld Nr. VIII (iv) aufgeführt werden: schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VIII ..." (geben Sie die Ziffer des Feldes an) und machen Sie die erforderlichen Angaben entsprechend der in dem Feld, in dem der Platz nicht ausreicht, vorgeschriebenen Art und Weise. Falls hinsichtlich zweier oder mehr Erklärungen der Platz nicht ausreicht, sollten Sie jeweils ein separates Fortsetzungsblatt für jede Erklärung einreichen. Wird dieses Fortsetzungsblatt nicht benutzt, so sollte es dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name: HAMERS-SCHNEIDER, Monika

Wohnsitz: DE

(Stadt und US-Staat, falls anwendbar, sonst Land)

Postanschrift: Am Elger 14

D-57258 Freudenberg

Staatsangehörigkeit: DE

Unterschrift des Erfinders: 

(falls nicht bereits das Antragsformular unterschrieben wird oder falls die Erklärung nach Einreichung der internationalen Anmeldung nach Regel 26ter berichtigt oder hinzugefügt wird. Die Unterschrift muß die des Erfinders sein, nicht die des Anwalts)

Datum: 29.03.2004

(der Unterschrift, falls das Antragsformular nicht unterschrieben wird oder der Erklärung, die nach Regel 26ter nach Einreichung der internationalen Anmeldung berichtigt oder hinzugefügt wird)

Name: KEMNITZER, Norbert

Wohnsitz: DE

(Stadt und US-Staat, falls anwendbar, sonst Land)

Postanschrift: Lahnstraße 74

D-57250 Netphen

Staatsangehörigkeit: DE

Unterschrift des Erfinders: 

(falls nicht bereits das Antragsformular unterschrieben wird oder falls die Erklärung nach Einreichung der internationalen Anmeldung nach Regel 26ter berichtigt oder hinzugefügt wird. Die Unterschrift muß die des Erfinders sein, nicht die des Anwalts)

Datum: 05.04.2004

(der Unterschrift, falls das Antragsformular nicht unterschrieben wird oder der Erklärung, die nach Regel 26ter nach Einreichung der internationalen Anmeldung berichtigt oder hinzugefügt wird)

Name: ZILLES, Alexander

Wohnsitz: DE

(Stadt und US-Staat, falls anwendbar, sonst Land)

Postanschrift: Simmerner Str. 3A

D-55490 Mengerschied

Staatsangehörigkeit: DE

Unterschrift des Erfinders: 

(falls nicht bereits das Antragsformular unterschrieben wird oder falls die Erklärung nach Einreichung der internationalen Anmeldung nach Regel 26ter berichtigt oder hinzugefügt wird. Die Unterschrift muß die des Erfinders sein, nicht die des Anwalts)

Datum: 29.03.2004

(der Unterschrift, falls das Antragsformular nicht unterschrieben wird oder der Erklärung, die nach Regel 26ter nach Einreichung der internationalen Anmeldung berichtigt oder hinzugefügt wird)

Name:

Wohnsitz:

(Stadt und US-Staat, falls anwendbar, sonst Land)

Postanschrift:

Staatsangehörigkeit:

Unterschrift des Erfinders:

(falls nicht bereits das Antragsformular unterschrieben wird oder falls die Erklärung nach Einreichung der internationalen Anmeldung nach Regel 26ter berichtigt oder hinzugefügt wird. Die Unterschrift muß die des Erfinders sein, nicht die des Anwalts)

Datum:

(der Unterschrift, falls das Antragsformular nicht unterschrieben wird oder der Erklärung, die nach Regel 26ter nach Einreichung der internationalen Anmeldung berichtigt oder hinzugefügt wird)